Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. H. Bennhold

Quantitative Auswertung der Ebnerschen Phenolreaktion an der kollagenen Faser

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Betz
aus Reutlingen

7613

1963

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. H. Bennhold

Quantitative Auswertung der Ebnerschen Phenolreaktion an der kollagenen Faser

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gerhard Betz
aus Reutlingen

1963

Dekan: Professor Dr. Dr. F r ö h l i c h

1. Berichterstatter: Dozent Dr. H. - P. M i s s m a h l

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.H. B e n n h o l d

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhalt

1. Teil. Literaturübersicht

Seite

I. Eigenschaften der kollagenen Fasern 5

1. Struktur 5
2. Chemische Zusammensetzung 8
3. Entwicklung 12
4. Reaktionen und Veränderungen 14
5. Die Wirkung des Formalins 19

II. Die Polarisationsoptik der kollagenen Fasern . 20

2. Teil. Eigene Untersuchungen

III. Methode 26

1. Die Behandlung der Präparate 26
2. Die Messung im einzelnen 27

IV. Ergebnisse 28

1. Untersuchungen zur Streubreite der Messmethode 28
2. Einfluss der Vorbehandlung auf die Phenolreaktion 28
3. Untersuchungen in farbigem Licht 31
4. Untersuchungen am Kollagen verschiedener Tierarten 32
5. Untersuchungen am Kollagen des menschlichen Coriums 33
   a) Das Kollagen der Erwachsenen 33
   b) Das Kollagen der Säuglinge 34
   c) Das Kollagen Kachektischer 34
   d) Das Kollagen von Patienten mit Funktionsstörungen der Nebennierenrinde . 36
   e) Das Kollagen eines Patienten mit Lupus erythematodes 36
6. Untersuchungen am Kollagen der menschlichen Leber 37

Seite

7. Färbung mit polychromem Methylenblau . . . 39

V. Diskussion der Ergebnisse 40

1. Die Messgenauigkeit unserer Methode . . . 40

2. Beitrag zur Theorie der Ebnerschen Phenolreaktion 40

3. Das menschliche Kollagen 44

a) Das normale Kollagen des Erwachsenen. 44

b) Das Kollagen der Säuglinge 44

c) Verkleinerung des Faktors bei Erwachsenen 45

d) Erhöhung des Faktors bei Erwachsenen. 46

Zusammenfassung 47

Literaturverzeichnis 49

L i t e r a t u r ü b e r s i c h t

I. Eigenschaften der kollagenen Fasern

1. Struktur

Die kollagenen Fasern bilden den Hauptanteil der geformten Interzellularsubstanz. Wir finden sie in Knochen, Knorpel, Zahnbein, Sehnen, Kapseln und im lockeren Bindegewebe. Die Fasern sind so angeordnet, wie es die Funktion verlangt. Frisch glänzen sie weisslich, haben ovalen Querschnitt, sind 0,01 bis 1 mm dick; ihre Länge schwankt zwischen Bruchteilen von Millimetern bis zu mehreren Zentimetern.

Die im Lichtmikroskop homogenen Kollagenfasern erscheinen im Elektronenmikroskop heterogen; sie setzen sich aus Fibrillen und einer Kittsubstanz zusammen. Die Kittsubstanz lässt sich in Kalk- und Barytwasser und in Pikrinsäure herauslösen. So isolierte Fibrillen sind 0,2 bis 0,5 µ dick. Sie lassen sich weiter unterteilen: Das weitwinkelige Röntgendiagramm (HERZOG u. GONELL[30], SCHERRER[71]) ergibt Fadenmoleküle als Grundstruktur.

Dieses Weitwinkeldiagramm ist für Kollagen spezifisch. Man ordnet nach ihm viele Fasern der sogenannten „Kollagengruppe" zu: das „Kollagen" des Histologen, Reticulin, Ichthyocol (aus Teleostomi), Elastoidin, Cornein (aus Coelenterata), Spongin. Hinzu kommen noch „sezernierte Kollagene". Sie werden im Gegensatz zu den obigen „mesenchymalen" Fasern, deren Genese grossenteils im Extrazellularraum stattfindet, von Epithelzellen sezerniert. Hierzu zählt u.a. das Kollagen des Regenwurms und der Schnecke. Sie alle geben das typische weitwinklige Röntgendiagramm und wurden daher (ASTBURY[2]) als „Kollagengruppe" von der „k m e f - Gruppe" (Keratin, Myosin, Epidermin, Fibrinogen, also den übrigen Eiweissfasern) abgetrennt.

WYCKHOFF, COREY u. BISCOE[85] und CLARK, PARKER, SCHAAD u. WARREN[11] führten das engwinklige Röntgendiagramm ein;

darin zeigten BEAR[4] und KRATZKY u. SEKORA[37] eine periodische Unterteilung der Fibrillen von 640 bis 650 Å entlang der Fibrille. Dieselbe periodische Querstreifung - mit dunklen A- und hellen B-Streifen - fotografierten als erste WOLPERS[84] und HALL, JAKUS u. SCHMITT[27] im Elektronenmikroskop. Diese Querstreifung ist nur dem mesenchymalen Kollagen eigen, im sezernierten Kollagen fehlt sie (REED u. RUDALL[67]). Man hat sie inzwischen selbst im Kollagen fossiler Tiere festgestellt (SANTOS u.Mitarb.[70]).

NEMETSCHEK u.Mitarb.[51] stellten innerhalb der „Makroperiode" von 640 Å 13 dunkle Bänder fest, die sich über die A- und B-Streifen verteilen, in A jedoch dichter liegen und breiter sind.

PAULING u. COREY[57][58] entdeckten das Prinzip der Spiralform bei den Polypeptidketten. Sie unterscheiden bei der k m e f - Gruppe die starkgewundene α- und die fast gestreckte β-Form. Bei der β-Form sind die einzelnen Ketten durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden; bei der α-Form liegen die H-Brücken intramolekular und halten die Spiralform aufrecht. Die α-Helix ist als ganzes noch leicht spiralig gewunden mit einer Windung auf 68 Å Achsenlänge (Superhelix nach PAULING).

Das Kollagen ist undehnbar wie die β-Helix, aber stärker gewunden, denn die Länge eines Restes in Achsenrichtung beträgt bei ihm mit 2,81 Å weniger als bei der β-Kette mit durchschnittlich 3,33 Å. COWMANN u. McGAVIN[12] und CRICK u. RICH[13] stellten künstlich poly-l-Prolin und spiraliges Polyglycin her. Prolin und Glycin sind die Hauptbestandteile des Kollageneiweisses (s.u.). Diese Ketten nahmen von selbst eine Spiralform an mit drei Resten pro Umdrehung, jeder mit einer durchschnittlichen Länge von 3,1 Å. Denkt man sich nun drei derartiger Polyprolin- bzw. Polyglycinketten leicht spiralig miteinander verdreht und betrachtet diese dreifache Kette als Ganzes (das „3-Ketten-Modell" nach PAULING u. COREY[57]), so erhält man 3 1/3 Reste pro Umdrehung und die geforderte Restlänge von 2,86 Å (ASTBURY[2]).

Zum selben Ergebnis, dass nämlich die Pyrrolidinreste verantwortlich für die Spiralform der Kollageneiweisskette sind, kam NETTER[53] durch sterische Uberlegungen:

Prolin und Oxyprolin lenken die Peptidkette aus der geraden Richtung ab und stabilisieren eine bestimmte Winkelung. Er gibt hierfür die folgende Darstellung:

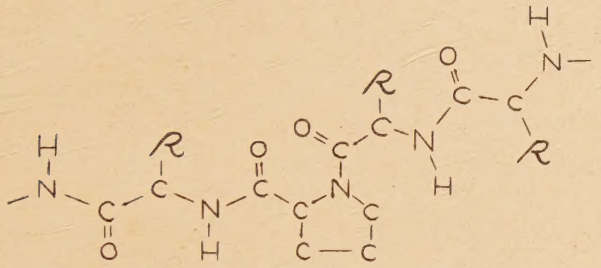


Abb.1. Ablenkung der Peptidkette durch Pyrrolidinreste (nach NETTER)

Wasserstoffbrücken halten die drei Ketten zusammen, sodass sie unter normalen Bedingungen undehnbar sind; somit könnte man das Kollagen zur β-Konfiguration rechnen. Allgemein nennt man das Kollagenmolekül aber eine α-Helix, denn die drei ursprünglichen Ketten, welche die Protofibrille bilden, gelten als eine Hauptspirale. Diese Dreierspirale ergibt das typische weitwinklige Röntgendiagramm.

Nach REED[68)69)] vereinigen sich mehrere Protofibrillen spiralig gewunden zum „Filament"; Filamente wiederum bilden durch steile spiralige Aufwindung Stränge und schliesslich Fibrillen. Die durchgehende Steilheit der Spiralwindungen lässt im Röntgendiagramm den Eindruck paralleler Strukturen entstehen.

VERZAR[80)] sah im Lichtmikroskop bei Auflicht in engem Winkel Spiralstrukturen an Sehnenfasern. Er beobachtete regelmässig 13 Windungen pro Millimeter. Diese zogen sich auseinander bei Dehnung und wurden zusammengestaucht bei Kontraktion der Faser. VERZARs Befund wurde allerdings bisher nie bestätigt.

Die Filamente sollen unter sich nicht alle gleichartig zusammengesetzt sein, sie unterscheiden sich im Aufbau ihrer Proteinketten (REED[69)]).

Der Durchmesser einer Fibrille wird mit 100-2000 Å angegeben (BEAR[6] und WASSERMANN[81]). Das Kollagenmolekül ist 3000 Å lang und 14 bis 15 Å dick; sein Molekulargewicht beträgt 300 000 (ENGEL[17], BEAR[6] und WASSERMANN[81]).

Wenn man sich die Moleküle jeweils um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander versetzt denkt, entsteht der Eindruck der periodischen Querstreifung von 640 bis 650 Å (NÉMETH-CSÓKA[50] und BEAR[6]).

2. Chemische Zusammensetzung

Das Kollagen zählt zu den Gerüsteiweissen (Skleroproteine). Sehr viele Autoren untersuchten seine chemischen Bestandteile. Es enthält Aminosäuren und Zucker, ist also ein Proteid. Nach BOWES, ELLIOT u. MOSS[8] finden sich im Rinderkollagen (bei anderen Säugetieren und beim Menschen sind die Verhältnisse ähnlich):

Glycin	26,57 %	Alanin	10,32 %
Prolin	14,42 %	Glutaminsäure	11,16 %
Oxyprolin	12,83 %	Asparaginsäure	6,95 %

Weiter finden sich in geringen Anteilen an

unpolaren Aminosäuren: Leucin, Valin, Phenylalanin, Methionin

OH-Gruppen tragenden Aminosäuren: Serin, Threonin, Tyrosin

basischen Aminosäuren: Arginin, Lysin, Hydroxylysin, Histidin.

Die OH-Gruppen tragenden Aminosäuren machen im ganzen etwa 15 % aus, die sauren und basischen zusammen etwa 21 %. Den Rest (64 %) bilden die unpolaren indifferenten Aminosäuren.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam GÖSSNER[19] in histochemischen Untersuchungen. Er stellte kein Tryptophan fest. Die Nitrobenzoylchloridreaktion fiel am Kollagen stark aus, was GÖSSNER auf die OH-Gruppen, allen voran die des Oxyprolin, bezog; denn Desaminieren schwächte die Reaktion nicht.

Der hohe Gehalt an Oxyprolin ist für das Kollagen so spezifisch, dass man seine Bestimmung bei chemischen Gewebsuntersuchungen allgemein als Kollagennachweis gelten lässt.

BERGMANN u. NIEMANN[7] nahmen an, dass in den Proteinketten die Folge „Gly - Oxypro oder Pro - eine andere Aminosäure" regelmässig wiederkehre. GRASSMANN u. Mitarb.[21] trennten im Prokollagen (s.u.) 11 Peptidfraktionen ganz spezifischer Zusammensetzung. Nur Glycin machte überall gleichmässig ein Drittel aller Reste aus. Die einen Fraktionen enthielten vorwiegend hochpolare Aminosäuren, die anderen mehr Prolin und Oxyprolin. Das einfachste Peptid in GRASSMANNs Untersuchungen hatte die Sequenz Gly - Arg - His. Ein anderes: Leu - Ala - Threo - Ser - Gly am Aminoende, 10 Pro + 5 Oxypro + 12 Gly + 6 andere in der Mitte, Phe - Glu - Leu - Asp - AspCOOH am sauren Ende. Grosse Teile der Kette werden also allein durch die Folge Gly - Pro (Oxypro) - Gly gebildet. Entsprechende Ergebnisse teilte SCHRÖDER[75] mit.

Nach BEAR[5][6] und GRASSMANN[21] entsprechen die Stellen, wo sich die polaren Aminosäuren anhäufen, den dunklen Bändern des Röntgendiagramms. Die basischen und sauren Seitenketten sind lang und müssen sich aufknäueln, wenn sie zwischen den Proteinketten Platz finden wollen. So verzerren sie die Spiralstruktur der Protofibrillen. Der Aufbau der hellen Streifen ist viel geordneter, weil in diesen die stark wasserstoffgebundenen Hydroxylaminosäuren überwiegen. Hier ist also die Elektronendichte geringer.

Nach PÖTZ[62] soll die Querstreifung durch Auflagerungen erzeugt werden und auf die Fibrillenoberfläche beschränkt sein. REED[68] nahm an, dass die Querstreifung durch abwechselndes Überkreuzen und Nichtüberkreuzen der Filamente entstehe. TOMLIN[78] glaubt, dass sich die Moleküle an einem Ende überlappen und am anderen Lücken frei lassen. - Alle diese Auffassungen konnten nirgends bestätigt werden.

Wahrscheinlich führen die Stellen mit ungeordnetem Aufbau der Ketten zu den feinen Querstreifen (s.S.7), während die Versetzung der Moleküle gegeneinander (s.S.9) für die „Makroperiode" von 640-650 Å verantwortlich ist.

GRASSMANN u.Mitarb.[20] fanden nicht ganz 1 % Kohlenhydrate im Kollagen (darunter Glucose, Galaktose, Mannose, Fucose, Glucosamin). Zahlreiche andere Autoren geben einen noch geringeren Kohlenhydratgehalt an. GRAUMANN[23] erfasste die

Kohlenhydrate mit der PAS-Reaktion, wobei er die Aminoalkohole vorher acetylierte. Sie liegen teilweise als Polysaccharide vor, meist esterartig mit einer OH-Gruppe an eine Proteincarboxylgruppe gebunden. Zum Teil sollen die Kohlenhydrate beim Reifungsprozess der Faser in Hauptvalenzbindung zwischen Peptidketten eingelagert werden (s.u.). Auf alle Fälle sind die Kohlenhydrate fest an die Faser gebunden, da ihr Gehalt - ausser Glucosamin - bei mehrfachem Lösen und Rekristallisieren nicht abnimmt.

BOWES u.Mitarb.[8] konnten im Kollagen Fett nachweisen; die Menge betrug nicht ganz 0,1 %.

Wasserstoffbrücken halten die Proteinketten untereinander zusammen (s.S. 8). Bei der regelmässigen Anordnung der Ketten kann man fast für jeden Rest eine H-Brücke annehmen (NETTER[53]). Nach RAMACHANDRANs[65] Berechnung kommen auf 3 Reste 2 H-Brücken. Sie führen von der Aminogruppe zur Carboxylgruppe des benachbarten Restes der nächsten Kette. Im wasserfreien Zustand ist

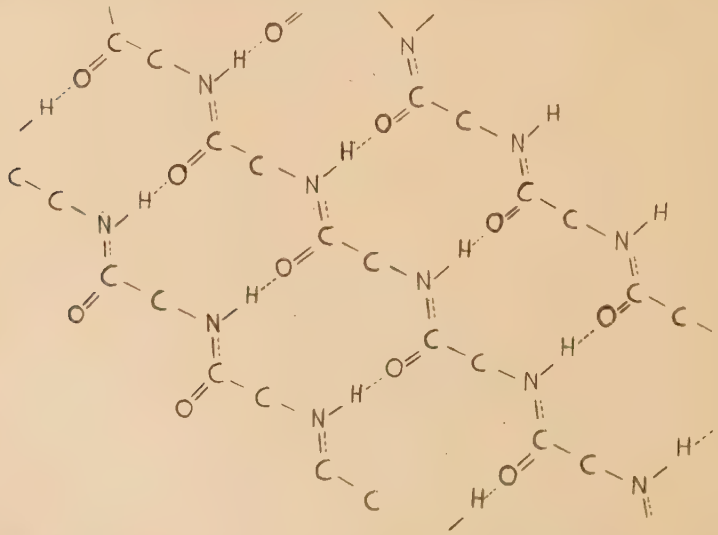


Abb.2. Wasserstoffbrücken zwischen Eiweissketten in regelmässiger Anordnung. Ausschnitt aus einer Spiralwindung. (nach NETTER)

die Bindungsenergie der H-Brücken hoch: 8 kcal pro Bindungsäquivalent. In wässriger Lösung sinkt sie durch Hydratation auf 2 kcal.

Die Peptidbindung bekommt durch Elektronenverlagerung partiellen Doppelbindungscharakter. Die Gruppierung $\overset{N}{O}\!>\!C$ liegt also in einer Ebene. Das ist nach NETTER räumliche Voraussetzung für die Ausbildung regelmässiger Spiralen. Er gibt hierfür das obige Schema (Abb.2).

Die OH-Gruppe des Oxyprolin liefert weitere Wasserstoffbrücken (s.u.).

Daneben kommen noch Ionenbindungen (z.B. zwischen Glutaminsäure und Lysin) und Van der Waalssche Kräfte in Betracht (GUSTAVSON[26]). Die Ionenbindungen reichen 50 bis 100 Å weit; sie bewirken wohl vor allem den Zusammenhalt der Fibrillen, beeinflussen also die Zugfestigkeit der Faser. Sie sind aber wegen der hohen Dielektrizitätskonstanten der wässrigen Lösung ziemlich schwach. Die H-Brücken reichen dagegen nur wenige Ångström weit. Sie sind damit nur für den Zusammenhang der Moleküle verantwortlich.

In der Grundsubstanz finden sich Proteine und Ionen aus dem Blut (NEUBERGER[52]), Kollagenvorstufen und als Hauptbestandteil Mucopolysaccharide. Nach HARTMANN[28] und QUINTARELLI[64] sind es Chondroitinschwefelsäure, Hyaluronsäure, Sialinsäure und Keratoschwefelsäure. Hyaluronidasen verändern je nach ihrer Konzentration den physikalisch-chemischen Zustand der Kittsubstanz (WASSERMANN[81]). Die Mucopolysaccharide sind teilweise auch in die Faser eingebaut und zwar orientiert, längsgerichtet wie die Eiweissketten. Das zeigte NÉMETH-CSÓKA[49] mit der Rivanolreaktion (s.u.). Der orientiert eingelagerte Anteil an Mucopolysachariden kann höchstens 6 % betragen, dann scheinen die entsprechenden Stellen am Eiweiss besetzt zu sein.

NÉMETH-CSÓKA[50] stellte Präcipitationsversuche mit gelöstem Kollageneiweiss an. Hierbei stellte er fest, dass die Anwesenheit von Mucopolysachariden (er arbeitete mit Chondroitinschwefelsäure) zur Ausbildung der kollagenen Fasern notwendig ist. Zugleich fand er Dicke, chemische Stabilität und Querstreifungsperiode der präzipitierten Fasern abhängig vom

Polymerisationsgrad der Chrondroitinschwefelsäure. Nach KÜHN u.Mitarb.[40] werden die Tropokollagenmoleküle (s.u.) durch sie „end to end" verbunden:

Die Mucopolysaccharide bilden „Zuckerbrücken" im Kollagen, esterartig mit dem Carboxylende, N-glykosidisch mit dem Aminoende verknüpft. Der grösste Teil hängt aber durch H-Brücken, ein anderer noch durch Valenzbindung an der Faser (NÉMETH-CSÓKA[50]).

Nach LINDNER u.Mitarb.[42] sind die Mucopolysaccharide an den Faserrändern angereichert; sie sollen hier physikalische und chemische Schutzfunktionen erfüllen und auch die PAS-Reaktivität bewirken.

Die interfibrilläre Kittsubstanz nimmt im Alter ab (VERZAR[80]). Bei pathologischen Vorgängen in der Haut erscheint die Grundsubstanz qualitativ und quantitativ viel leichter veränderlich als die Fibrillen (BRAUN-FALCO[9]).

3. Entwicklung

Über die Weise und den Ort der Fibrillogenese der Kollagenfaser finden sich zahlreiche sehr widersprüchliche Angaben. MERKER[45] stellte durch genaue elektronenoptische Untersuchungen fest, dass sichtbare Fibrillen nur ausserhalb der Fibroblastenzellmembran liegen. Nach PALADE u.Mitarb.[55] und HIRSCH[31] werden Aminosäuren auf der Oberfläche der PALADE-Granula wie auf Matrizen zu Polypeptidketten vereinigt und dann in das Hohlraumsystem des endoplasmatischen Reticulum (PALADE[56]) eingeschleusst. So muss man sich auch die Synthese der Kollagenvorstufen denken. Sie stauen sich dann im endoplasmatischen Reticulum an und bilden weite Zisternen (MERKER[45]). Diese entleeren schliesslich die gebildeten Eiweissmassen nach aussen. Darin liegen die Eiweissketten schon als Tripelhelix vor, d.h. es sind - allerdings aufgeknäuelte - monomere Tropokollagenmoleküle. Sie strecken sich dann beim Zusammenlagern zu Fibrillen oder durch Anlagern an schon gebildete Fibrillen („Progressive Wachstumsphase" nach SCHWARZ u.Mitarb.[77]).

Vorher bilden die Fibroblasten wahrscheinlich schon die Kittsubstanz, welche zur Fibrillogenese notwendig ist(s.S.12).

Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von PROPST u. RATZENHOFER[63] lassen sich die frühembryonalen Fasern nur unregelmässig versilbern. Im 5. Lunarmonat beginnt die periodische Versilberung, d.h. Silber lagert sich innerhalb der Fibrille in den dunklen A-Abschnitten ab. Allerdings soll es nach GRASSMANN[20] manchmal auch in B vorkommen. Ebenso beginnt nun Rotfärbung mit Fuchsin, während sich die früheren, „präkollagenen" Fasern gelb anfärben. GRASSMANN[22] bestätigte diese Befunde. Nach ihm beruht die positive PAS-Reaktion bei reifen Fasern auf den Kohlenhydraten der Kittsubstanz und denen in der Fibrille, bei den unreifen allein auf den Kohlenhydraten der Kittsubstanz, den Mucopolysachariden. Die präkollagenen Fasern bleiben bis zu einem halben Jahr post partum nachweisbar. Sie geben eine andere UV-Absorption und beim Röntgenverfahren Unterschiede im Kleinwinkelgebiet. Das soll auf eine geringere Zahl zwischenmolekularer H-Brücken hindeuten (s.u.) (KRATZKY[37]).

In genaueren Untersuchungen fanden GRASSMANN[22] und SCHWARZ[76], dass bei den unreifen Fibrillen (wie in reticulären Fasern) diese unregelmässige Versilberung nur an der Oberfläche erfolgt; mit der Reifung liessen sich die Fasern immer stärker periodisch innenversilbern. Parallel dazu stieg auch die Dicke der Fibrillen.

OREKHOVITCH[54] löste in Citratpuffer aus der kollagenen Faser einen Teil heraus, den er Prokollagen nannte und als Kollagenvorstufe ansah. Der Gehalt war bei jungen Tieren am höchsten, bei alten und vor allem bei skorbutischen Tieren - wo die Faserneubildung fehlt - ganz niedrig. Mit radioaktivem Glycin stellte er die Umwandlung des Prokollagen in Kollagen dar; sie dauert zwei bis drei Wochen.

In der Grundsubstanz fanden GRASSMANN[22], GROSS[25], JACKSON[33], LINDNER u.Mitarb.[42] u.a. eine noch frühere Vorstufe, die sie Tropokollagen nannten. GRASSMANN gab eine zusammenfassende Darstellung dieser Stoffe:

Das Tropokollagen ist durch schwach alkalische, neutrale oder saure Salzlösung extrahierbar. Seine Querstreifung mit

einer Periodenlänge von 2000 Å zeigt, dass seine Struktur dem reifen Kollagen noch nicht ganz entspricht. Es ist metabolisch hochaktiv, befindet sich also im Umbau (JACKSON[33]).

Das Prokollagen lässt sich mit Säuren oder sauren Puffern extrahieren. In alkalischer oder neutraler Lösung fällt es aus. Seine periodische Querstreifung misst schon 650 Å. Es ist metabolisch weniger aktiv und lässt sich in neu gebildeten Kollagenfasern nachweisen. Im Hautkollagen Jugendlicher findet es sich zu 10 %, bei alten Menschen zu 5 % (OREKHOVITSCH[54] und KÜHN[39]).

Das reife Kollagen, unlösbar in schwach alkalischer oder neutraler Lösung, zeigt fast keine metabolische Aktivität mehr.

Tropo- und Prokollagen haben dieselbe chemische Zusammensetzung; beide können Nadelkristalle bilden (KÜHN[39]). Sie beweisen durch Doppelbrechung, dass sie Fibrillartextur besitzen, selbst wenn mikroskopisch noch keine Fasern nachweisbar sind (SCHMIDT[72]).

BANGA u. BALO[3] fanden im Prokollagen einen hohen Betrag (6-8 %) fest an das Fasereiweiss gebundener Mucopolysaccharide.

Nach KÜHN u.Mitarb.[39] ist das Prokollagen in 80-proz. Phenol völlig löslich. Das reife Kollagen löst sich nur zu 18,8 % darin.

4. Reaktionen und Veränderungen

Seit langem sind bezeichnende Eigenschaften des Kollagens bekannt:

Es schrumpft in der Wärme und in bestimmten Elektrolytlösungen, lässt sich in kochendem Wasser gelatinisieren, es quillt in Säuren und Laugen. Enzymatischem Abbau gegenüber ist es weitgehend resistent. Lediglich saure Pepsinlösung und leicht alkalisches Trypsin bei höheren Temperaturen greifen es an; ausserdem produzieren gewisse Anaerobier eine spezifische Kollagenase, die es hydrolytisch abbaut (JENNISON[35]). Das Kollagen ist immunologisch träge. Mit Säurefuchsin und Anilinblau lässt es sich stark anfärben. Die Faser ist praktisch undehnbar und sehr zugfest.

Nach LETTERER[41] muss man eine Aufsplitterung der Faser von der eigentlichen Verquellung unterscheiden. Werden die Mucopolysaccharide zerstört, kann Wasser in die Fibrillen eindringen und die molekularen Bindungen brechen; die Fibrillen lösen sich irreversibel auseinander.

Die Kittsubstanz als hydrophiles Gemisch aus Mucopolysacchariden und Protein kann viel Wasser speichern. Nach LINDNER u. Mitarb.[42] nehmen Fasern bei starker Quellung in n/10 Oxalsäure um das 2,5- bis 3-fache ihres Trockengewichtes zu; wenn man aber alle freien polaren Gruppen der Eiweissketten mit Wasser abgesättigt denkt, lässt sich eine Bindungskapazität von 19,7 g Wasser pro 100 g Kollagen errechnen. Der allergrösste Teil des Wassers kann also nur locker gebunden vorliegen, dafür kommt eben die Kittsubstanz in Frage In physiologischen pH-Bereichen schützt sie die Fibrillen vor zu starker Quellung(LINDNER[42]). Säuren und Laugen verändern sie chemisch, in extremen pH-Bereichen steigt darum die Quellung der Fibrille an.

Die Säure- und Laugenquellung erklären LLOYD u. MARRIOTT[43] als Donnan-Effekt durch ionisierte saure und basische Gruppen am Eiweiss. Die Faser quillt auch in Neutralsalzlösungen stark; das wird auf den lyophilen (Hofmeister-)Effekt dieser Lösungen zurückgeführt. Sie vermögen Querbindungen zu zerstören: Elektrolyte sättigen ionisierte Gruppen ab, neutrale Moleküle zerstören H-Brücken.

Manche Autoren beobachteten bei der Quellung (und bei der Schrumpfung) eine Gegeneinanderbewegung der spiralig umeinander gewundenen Filamente (RATZENHOFER u. PROBST[66] und LINDNER[42]).

Bei 40°C zeigt das native menschliche Haut- und Sehnenkollagen noch keine Strukturveränderung. Bei 60-65° aber schrumpfen die Fasern auf 1/3 bis 1/4 ihrer Länge. Wenn man Kollagen kocht, ist es nach 2 Min. aufgelöst.

HERMANN[29] sah im Schrumpfen eine Art Koagulation oder Denaturierung. Denaturierung und Schrumpfung benötigen Aktivierungsprozesse, die Temperatur und die Entropie müssen stark ansteigen. WEIR[83] mass für ΔH 141 kcal/mol, für ΔS 349 kcal/mol + °C. Der Kontraktionsprozess selber soll

dann adiabatisch ablaufen ($\Delta H = 0$). Die Proteinkette nimmt die wahrscheinlichste Konfiguration ein, diese ist weniger asymmetrisch, also kürzer als in der nativen Faser (BEAR[5]). Die Schrumpfung gehört somit unter die Denaturierung, die NETTER[53] definierte als „kontinuierlichen oder abrupten Vorgang, während dessen die Moleküle nach Lockerung der Bindungen in wahrscheinlichere Zustände übergehen".

Trocknen lässt die Schrumpfungstemperatur stark ansteigen, vorausgehende Quellung senkt sie (KATZ[36]). Denn in der hydrierten Faser wird ein Teil des ΔH von der Wärme geliefert, die bei der Hydratation entsteht (BEAR[5]).

Das normale weitwinklige Röntgendiagramm verschwindet während der Schrumpfung und wird durch ein amorphes Diagramm ersetzt.

VERZAR[80] hängte Gewichte an die Fasern und liess sie sich in Ringerlösung bei 62° kontrahieren. Beim Abkühlen ging die Kontraktion zurück. Diese Kontraktion liess sich an derselben Faser wiederholen. Bei höherem Erhitzen wird die Kontraktion aber irreversibel. Zugleich erhält die Faser nun Gummielastizität, es wird also eine einschneidende strukturelle Veränderung gesetzt. BANGA (in VERZAR) deutet sie als Zerstörung der Bindungen der Mucopolysaccharide an das Eiweiss, die sonst die Kontraktion verhindern. Hitze löst die Mucopolysaccharide heraus, umso mehr, je länger sie einwirkt.

GUSTAVSON[26] gibt an, dass beim Wegfall der Salzbindungen zwischen den Protofibrillen die Schrumpftemperatur um 12-14° sinkt; ohne die H-Brücken sinkt sie aber um 50-60°. - Kollagen von Kaltwasserfischen mit einer Schrumpftemperatur von 35° enthält 6,0 % Oxyprolin; mit steigendem Oxyprolingehalt steigt auch die Schrumpftemperatur bis zu 60-70° des Kälberkollagens mit 12,7 % Oxyprolin. Die H-Brücke vom OH des Oxyprolin aus scheint stärker zu sein als die Keto-Imid-Brücken. Acetylierung der OH-Gruppen senkte die Schrumpftemperatur von 62° auf 40°, zugleich quollen die Fasern. Damit und in zahlreichen anderen Versuchen konnte GUSTAVSON die Bedeutung der OH-Gruppen für die Stabilisierung des Kollagens weiter beweisen.

VERZAR fand bei seinen Versuchen an Kollagenfasern alter Tiere eine grössere Kontraktionskraft als an den Fasern junger Tiere. Er brauchte schwerere Lasten, um die Kontraktion zu verhindern. Zugleich zeigten die alten Fasern eine viel geringere Elastizität nach längerem Erhitzen. Beides gibt auch ELDEN[15)] an. VERZAR erklärt es mit einer Zunahme der Querbindungen im Alter. Von diesen sollen beim Erhitzen mehr übrigbleiben, die Stabilität sinkt also weniger. Beim Kontrahieren fassen die vermehrten Querbindungen die Brownsche Molekularbewegung der einzelnen Ketten stärker zu einer einheitlichen Leistung zusammen. - VERZAR denkt vor allem an die Bindungen zwischen Protein und den Mucopolysachariden.

BROWN u. CONSDEN[10)] stellten am menschlichen Kollagen einen Anstieg der Wärmestabilität bis zum 25. Lebensjahr fest. Im Alter soll dann ein neuer Anstieg erfolgen, dem nun aber degenerative Altersveränderungen zugrunde liegen sollen. Sie fanden eine Schrumpftemperatur beim Kind von 55°C, beim Erwachsenen von 59,8°, beim Greis von 61,2°. Den Stabilitätszuwachs in der Jugend kann man sich mit der Ausbildung der Querverbindungen des reifen Kollagens erklären. Im Alter vermutet GUSTAVSON pathologische Einlagerungen, z.B. Quervernetzung durch Aldehyde wie Methylglyoxal oder hochkonjugierte Glyceride, Fettsäuren oder deren Peroxyde. Dabei können aromatische Aminosäuren Chinoidcharakter annehmen. Er vergleicht diese Möglichkeiten mit der Selbstgerbung der Proteinstrukturen bei Wirbellosen, die Substanzen mit gerbender, quervernetzender Eigenschaft einlagern; ausserdem spalten sie polare Seitenketten ab, wodurch die Hydratation sinkt.

Andererseits wird die Stabilität sinken, wenn solche Aminosäuren abnehmen, die Querverbindungen liefern. Zum Beispiel soll das abnormale Kollagen in den Herden der rheumatoiden Arthritis weniger Oxyprolin enthalten; in der Tat ist es weniger stabil und in Alkali leichter löslich als normales. Eine Abnahme des Oxyprolingehaltes wäre leicht denkbar, wenn die Proteinketten vorwiegend angegriffen würden, die besonders viel Oxyprolin enthalten (GUSTAVSON). Ein anderes Beispiel ist das neutralsalzlösliche Tropokollagen; es enthält weniger Oxyprolin als das reife Kollagen.

GUSTAVSON stellte im Regenwurmkollagen mit 14,5 % einen geringeren Gesamt-N-Gehalt fest als bei Wirbeltieren (Rind 18,3 %), es sind damit mehr Nichteiweisstoffe beigemengt. Der Anteil des Oxyprolin beträgt bezogen auf den Gesamtstickstoffgehalt 15 %, also mehr als bei Wirbeltieren. WATSON u. SMITH[82] geben noch höhere Werte an. Auch die aliphatischen Hydroxyaminosäuren sind höher konzentriert als im Wirbeltierkollagen. Dagegen ist der Anteil des Prolin ganz gering (3 %). Das Regenwurmkollagen schrumpft aber schon bei 30-40°, also viel früher als oxyprolinärmere Kollagene.

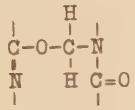
BEAR[5] und WATSON u. SMITH[82] erhielten zwar das normale weitwinklige Röntgendiagramm der Kollagene, eine Querstreifung konnten sie aber nicht nachweisen; sie vermissten auch das typische engwinklige Diagramm. Das Regenwurmkollagen entspricht also in seiner Feinstruktur nicht ganz dem der höheren Tiere. GUSTAVSON hält die Ausbildung stabilisierender H-Brücken vom Oxyprolin aus nur für möglich, wenn spezielle räumliche Voraussetzungen erfüllt sind.

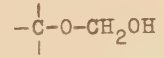
Nach neueren Untersuchungen sehen PIEZ u. GROSS[61] im Anstieg der Schrumpftemperatur eher eine Funktion der Gesamtzahl an Iminosäuren, Prolin und Oxyprolin, als des Oxyprolingehalts allein. Sie glauben, dass die Molekülstruktur des Kollagens grossenteils durch den starren Pyrrolidinring aufrechterhalten wird, der keine grossen Veränderungen der Kettenform zulässt und die Brownsche Molekularbewegung hemmt. Die OH-Gruppe des Oxyprolin soll vielmehr zwischenmolekularer Bindung dienen, wobei sie aber durch die aliphatischen Hydroxyaminosäuren teilweise ersetzt werden kann (auch ASTBURY[2]).

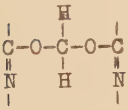
Vielleicht kommt der OH-Gruppe des Oxyprolin gerade darum die von GUSTAVSON so betonte Bedeutung zu, weil sie an einem sterisch bevorzugten und besonders stabilen Molekül sitzt.

5. Die Wirkung des Formalins

Der Formaldehyd, als Gas $O = C < {}^{OH}_{OH}$, in wässriger Lösung als $HO-\overset{H}{\underset{H}{C}}-OH$ oder $H-\overset{H}{\underset{OH}{C}}-OH$ vorliegend, fixiert das Eiweiss durch Vernetzung(ZEIGER [86]). Er soll unter Wasseraustritt Brücken zwischen benachbarten reaktionsfähigen Gruppen schliessen; z.B. zwischen Phenylgruppen und sekundären Alkoholen, auch zwischen C und N der Hauptkette, wenn man sich die Peptidbindung in der Enolform vorstellt (Abb. 3á).

a) 

b) 



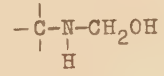


Abb.3 a) und b). Anlagerung des Formalins an das Eiweiss (nach ZEIGER)

Es können auch sauerstoffreie Methylenbrücken ($-CH_2-$) entstehen. Ausserdem kann sich Formalin an sekundäre Alkoholgruppen und Aminogruppen anlagern; dabei entstehen primäre Alkoholgruppen (Abb.3 b).

Durch solche Abschirmung basischer Gruppen werden die anionischen Eigenschaften der Proteine verstärkt.

HOLCZINGER[32] nimmt an, dass Aldehydgruppen des gebundenen Formalins auch frei bleiben können.

Die Vernetzung ist teilweise reversibel, das Gewebe hält das Formalin in Wasser aber zäh fest. In saurem Milieu, unter Wärmeeinwirkung oder in Alkohol wird ein Teil des gebundenen Formaldehyds wieder frei. (Formalinfixierte Gewebe schrumpfen bei Alkoholentwässerung.)

Nach HOLCZINGER[32] können 1-3 % Formalin an das Eiweiss gebunden werden.

Die Quervernetzung durch Formalin setzt die Schrumpftemperatur hinauf (GUSTAVSON[26]). Nach EWALD[17] gewinnt formalinfixiertes Kollagen nach maximaler Hitzeschrumpfung seine ursprüngliche Länge, nach BEAR[5] sein weitwinkliges Röntgendiagramm wieder; auch drei Höfe des engwinkligen Diagramms treten wieder auf. Die Kollagenstruktur bleibt also weitgehend erhalten; dank der Formalinbrücken konnten sich die Protofibrillen nicht hoffnungslos verwirren. Der Entropieanstieg beim Schrumpfen wird geringer (WEIR[83]). Die Fasern verkürzen sich auch weniger (BEAR[5]).
Nach ELDEN[15] wird die Kontraktionskraft ähnlich wie im Alter grösser, die Elastizität geringer. Ausserdem nehmen die Wasserbindungsfähigkeit und der Hydratationsgrad des Kollagens ab (GUSTAVSON).

Die Zugfestigkeit der Faser bleibt unverändert; Formalin greift also in den Faserzusammenhalt nicht ein. Es verändert die Kollagenstruktur auf der Ebene der Protofibrillen.

II. Die Polarisationsoptik der kollagenen Faser

Optisch anisotrope Körper zeigen im polarisierten Licht Doppelbrechung. Die physikalischen und biologischen Grundlagen der Doppelbrechung und die Messmethoden beschreibt W.J.SCHMIDT in zahlreichen Arbeiten ausführlich (z.B. [74]). Kurze Darstellungen gaben MISSMAHL[47] und UNSELD[79]. Darum verzichten wir auf eine Beschreibung der optischen Anisotropie und beschränken uns darauf, die polarisationsoptischen Eigenschaften der Kollagenfaser zu nennen.

Die Faser besitzt positiv einachsige Doppelbrechung; d.h. die wirksame Indexellipse eines Schnittes steht mit ihrer grossen Achse in Faserrichtung. Das Vorzeichen ist hier nur relativ und bezieht sich auf die Längsachse der Faser; dabei ist es gleichgültig, ob - nach der physikalischen Definition des Vorzeichens - die Indexellipse aus einem langgestreckten oder abgeplatteten Ellipsoid stammt; die Lage der optischen Achse spielt also keine Rolle.

Negative Doppelbrechung einer Faser bedeutet andererseits einfach, dass die wirksame Indexellipse mit der grossen Achse quer zur Faserlänge steht.

Als Wienerscher Mischkörper besitzt die Kollagenfaser Eigen- und Formdoppelbrechung; beide sind positiv. Die Eigendoppelbrechung beruht auf der Molekularstruktur der Fadenmoleküle und ihrer raumgitterartigen Zusammenfassung in den Fasern oder in Faserteilen (Micellen nach SCHMIDT). Die Fasertextur ist formdoppelbrechend, weil sie aus zwei submikroskopischen, geordneten Komponenten verschiedener Brechzahl besteht: die optisch dichteren Fibrillen und Micellen sind mit der Kittsubstanz imbibiert, deren Brechvermögen geringer ist.

Die Anisotropie der Kollagenfaser zeigt sich neben der Doppelbrechung nach SCHMIDT[72] auch in ihrer dichroitischen Anfärbbarkeit, in der anisodiametrischen Quellung (starke Dickenzunahme bei geringer Verkürzung), in der längs grösseren Wärmeleitfähigkeit, darin dass sich aufgehängte Sehnen im Magnetfeld paramagnetisch zu den Kraftlinien einstellen, im Röntgendiagramm und in der Wärmekontraktion in Richtung der optischen Achse.

Die Formdoppelbrechung ist schwach gegenüber der Eigendoppelbrechung; wenn man die Faser mit einer Lösung des Brechvermögens $n_D = 1{,}547$ imbibiert, fällt die Formdoppelbrechung weg, es bleibt allein die Eigendoppelbrechung. $n_D = 1{,}547$ bezeichnet nun das der Fasersubstanz eigentümliche Refraktionsvermögen (PFEIFFER[60]).

Bei starkem Erhitzen verschwindet die Eigendoppelbrechung (PERNIS u.Mitarb.[59]).

An kontrahierten Fasern sahen SANTOS u.Mitarb.[70] im polarisierten Licht schraubig quer zur Fibrille laufende dunkle Banden. Bei starker Kontraktion sahen sie auch Streifen von Polarisationsfarben. Sie führen das auf die stärkere Verschraubung bei der Kontraktion zurück, wobei sich Faserteile mit wechselnden Dichteunterschieden überlagern.

Beim Quellen sinkt durch Desorientierung der Moleküle die Doppelbrechung ab. Aufsplitterung der Faser durch zunehmende Hydrolyse bringt die Doppelbrechung schliesslich ganz zum Verschwinden.

Formalinfixierung lässt nach PFEIFFER[60] die polarisationsoptischen Eigenschaften der Kollagenfaser ziemlich unberührt.

Im sichtbaren Licht werden keine Besonderheiten der Doppelbrechung beschrieben. Im infraroten Licht stellten AMBROSE u. ELLIOTT[1] Dichroismus fest. Er ist für Kollagen spezifisch und wird auf die Keto- und Iminogruppe der Peptidbindung und deren H-Brücken zurückgeführt; alle diese Bindungsebenen stehen ziemlich senkrecht auf der Proteinkettenachse. Auch ausgefällte, gedehnte Gelatine zeigt diesen Dichroismus.

Im Jahre 1884 entdeckte V.von EBNER[14], als er die kollagene Faserscheide der Cyclostomenchorda mit Nelkenöl aufhellte, dass sich die positive Doppelbrechung in eine negative umkehrte. Dabei blieb die längsverlaufende optische Achse erhalten. Bald erkannte er als wirksamen Stoff im Nelkenöl das Eugenol, ein Phenolderivat.

Phenol ist der einfachste Alkohol der Benzolreihe; ein Wasserstoffatom des Benzols ist durch OH ersetzt. Durch diese OH-Gruppe wird es wasserlöslich. In flüssigem Zustand können sich nach SCHMIDT[72] die flachen Moleküle zu Säulen aus übereinandergeschichteten Blättchen assoziieren.

Unter der Gruppe der Phenole fasst man 1-, 2- und 3-wertige Phenole zusammen, entsprechend 1-, 2- oder 3-facher OH-Substitution; die beiden letzteren treten in je drei stellungsisomeren Formen auf je nach dem Sitz der OH-Gruppen. Zu den Phenolen zählt man aber auch alle anderen Derivate des Phenols; die Substitutionsmöglichkeiten sind fast unübersehbar. Das H der OH-Gruppe gibt den Phenolen schwach sauren Charakter, es kann durch Metalle und andere Radikale ersetzt werden.

Für die EBNERsche Reaktion eignen sich aber nur wenige Vertreter. von EBNER selbst fand das einwertige Phenol weitaus am wirksamsten; von den zweiwertigen konnte er nur das ortho- und meta-Dihydroxybenzol, also Brenzkatechin und Resorcin gebrauchen. Die Paraverbindung war ungeeignet, ebenfalls alle dreiwertigen Phenole. Er erhielt auch eine Reaktion mit der p-Oxybenzoesäure, mit Benzaldehyd, Zimtaldehyd und Trinitrophenol (Pikrinsäure). Warum die o- und m-Verbindungen der p-Form überlegen sind, weiss man noch nicht; auch bei den

Kresolen ist die o-Form und m-Form stark wirksam, die p-Form nicht.

Will man wasserunlösliche Phenole benutzen (wie z.B. das Eugenol), so muss das Objekt zuerst mit Alkohol entwässert werden.

SCHMIDT[72] beschrieb die EBNERsche Phenolreaktion sehr ausführlich. Er sah mit Phenolen, bei denen die Reaktion langsam abläuft (z.B. Salicylaldehyd), wie die Umkehr der Doppelbrechung unter Durchlaufen einer Folge anomaler Polarisationsfarben geschah: Die umgewandelten Stellen erhalten eine andere Dispersion der Doppelbrechung und kompensieren den Gangunterschied der noch unveränderten, aber eben für eine Farbe nach der anderen.

Das Mass der erreichten negativen Doppelbrechung steigt mit der Konzentration des angewandten Stoffes bis zu einem Maximum, wenn das Kollagen gesättigt ist. KÜNTZEL u. SCHWANK (in SCHMIDT[72]) gaben für die Umkehr des Vorzeichens folgende notwendige Konzentrationen an:

bei wässrigen Phenollösungen	4 %
bei alkoholischen Phenollösungen	40 - 50 %
bei wässrigen Resorcinlösungen	8 - 10 %

(Angaben in Gewichtsanteilen, bezogen auf das Trockengewicht der benutzten Hautmenge.)

Sinkt die Konzentration, dann nimmt der Lösungsdruck der adsorbierten Teilchen zu. Beim Auswaschen wird die Doppelbrechung wieder positiv.

Temperatursteigerung hebt die negative Doppelbrechung auf; ebenso Anspannen der Faser: hier kann der photoelastische Effekt die negative Doppelbrechung in eine positive überkompensieren.

von EBNER erkannte, dass seine Reaktion von der Brechzahl der benutzten Stoffe unabhängig war. Sie konnte nach seiner Ansicht auch nicht auf einer Abscheidung submikroskopischer Kriställchen beruhen, denn beim Erwärmen verschwand sie allmählich und nicht plötzlich bei einem etwaigen Schmelzpunkt. Er glaubte, er könne sie auf Spannungen in den Gewebsmolekülen beziehen, erzeugt durch die Phenole. Weil die Stoffe spezifisch waren und die Wirkung mit der Konzentration zunahm,

dachte er an eine Art „physikalischer Verbindung".

SCHMIDT fasst die Reaktion als eine topochemische auf. Er erklärt sie durch orientierte Adsorption der Phenolmoleküle an die Eiweissketten. Orientiert muss die Einlagerung sein, denn ungeordnet könnte sie höchstens die positive Formdoppelbrechung senken oder aufheben; die bleibende positive Eigendoppelbrechung würde das Vorzeichen immer positiv halten. Nur Phenole mit einer hydrophilen Gruppe können wirken, sie werden sich also an die hydrophilen Gruppen des Eiweisses anlagern. Mit zunehmender Quellung können sich immer tiefer liegende Fibrillen beteiligen.

Die normale Adsorptionsisotherme gibt aber den quantitativen Ablauf der Reaktion nicht wieder. Darum nehmen KÜNTZEL u. SCHWANK (in SCHMIDT[72]) an, dass die monomeren Phenolmolekeln polymere Assoziationsformen bilden. An die ersten adsorbierten Molekeln sollen sich weitere anlagern, so entstehen Blättchensäulen parallel zu den Proteinketten mit den einzelnen Phenolmolekeln senkrecht dazu.

Einwertige Phenole haben nun ihre Hydrophilie verloren, sie sitzen fest an der Eiweisskette. Darum sind sie optisch wirksamer als zweiwertige, die noch eine freie OH-Gruppe haben und in das Lösungsmittel zurücktreten können.

Temperaturanstieg löst durch zunehmende Brownsche Molekularbewegung die adsorbierten Molekeln ab und stört die Säulenordnung. Die negative Doppelbrechung verschwindet zwischen 30 und 60°, je nach Quellungszustand und Vorbehandlung (KÜNTZEL u. SCHWANK).

Gerbstoffe besetzen die hydrophilen Gruppen des Kollagens. An gegerbten Fasern läuft die Phenolreaktion langsamer oder gar nicht mehr ab.

Die EBNERsche Phenolreaktion ist für Kollagenfasern so spezifisch, dass sie ihrer Erkennung im histologischen Präparat dienen kann, selbst wenn keine Faserstruktur sichtbar ist (z.B. im hyalinen Knorpel). Ausser der Kollagenfaser reagieren noch Elastin (soweit es vorher doppelbrechend war; SCHMIDT glaubt, dass auch manchmal kollagene Begleitfasern eine Reaktion vortäuschen), Gelatinefäden, Fasern der Linsenkapsel, Spongin, Chitin und aus tierischem Schleim künstlich gesponnene

Fäden (MISSMAHL[46]). Diese Fasern mindern aber praktisch den diagnostischen Wert der Reaktion nicht. Ganz sicher kann man sagen, dass Fasern ohne Umkehr kein Kollagen sein können.

Sumachgerbung verleiht der kollagenen Faser auch negative Eigendoppelbrechung, die sich als negative Doppelbrechung auswirkt, wenn man die Faser in Alkohol entwässert (SCHMIDT[72]). Dasselbe gibt PFEIFFER[60] für die Tanningerbung an.

Rivanolfärbung macht die Doppelbrechung der Kollagenfaser ebenfalls negativ (ROMÁNYI in NÉMETH-CSÓKA[49]). Diese Reaktion hängt von den Mucopolysachariden in der Faser ab; sie müssen orientiert eingelagert sein und ihrerseits (nach MISSMAHL[47]) das negativ doppelbrechende Rivanol gerichtet anlagern.

Analog zu diesen Reaktionen entdeckte MISSMAHL[47], dass Glycerineinbettung die positive Doppelbrechung reticulärer Fasern umkehrte. Er fand die Stärke seiner Reaktion abhängig vom Lipoidgehalt der Faser. Zur Darstellung des Reaktionsausmasses unabhängig von der Faserdicke führte er einen Faktor ein, der die negative Doppelbrechung zur positiven in Beziehung setzte:

$$\frac{a + b}{a}$$

Darin bedeutet a den Gangunterschied in mμ bei der positiven Doppelbrechung der nativen Faser, b den der negativen nach der Reaktion.

Wenn die negative Doppelbrechung zunimmt, erhöht sich also der Faktor $\frac{a + b}{a}$. Tritt keine Umkehr der Doppelbrechung ein, sondern nur Abschwächung der positiven, dann liegt dieser Faktur unter 1 .

Eigene Untersuchungen

Wir stellten uns die Frage, ob sich durch quantitative Auswertung der Phenolreaktion sonst nicht fassbare Veränderungen am Kollagen erfassen liessen. Dabei gingen wir von der Vorstellung aus, dass Änderung in der Struktur oder der chemischen Zusammensetzung der Faser den Gangunterschied der erzielten negativen Doppelbrechung verändern können.

III. Methode

1. Die Behandlung der Präparate

Sämtliche Untersuchungen wurden mit dem Polarisationsmikroskop „Biopol" der Firma Leitz durchgeführt. Unsere Optiken sind frei von Spannungsdoppelbrechung. Zu allen Messungen benutzten wir ein Objektiv 25:1, A = 0,5. Die Gangunterschiede bestimmten wir mit dem elliptischen Kompensator nach BRACE-KÖHLER oder, wenn sie höher lagen als dessen oberer Messwert, mit dem BEREK-Kompensator. Als Lichtquelle diente eine Niedervoltlampe. Vergleichsmessungen in monochromatischem Licht erfolgten mit dem Monochromator der Firma Leitz; hierbei stammte das Licht aus einer Xenonlampe.

Die Präparate fixierten wir in 4-proz. Formalin. Nach mindestens 24-stündiger Fixierung fertigten wir Gefrierschnitte an bei einer Einstellung des Mikrotoms auf 5 µ Schnittdicke. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser aufgefangen.

Unter Wassereindeckung des Präparates massen wir die positive Doppelbrechung der kollagenen Faser. Anschliessend wurde derselbe Schnitt mit Filtrierpapier abgetrocknet und mit einem Tropfen einer 80-proz. wässrigen Phenollösung eingedeckt. Das Abtrocknen war nötig, damit die Schnitte fest auf dem Objektträger hafteten, die Messwerte bleiben bei der hohen Phenolkonzentration unbeeinflusst von geringer Feuchtigkeit.

Ausserdem färbten wir Präparate mit polychromem Methylenblau nach Unna an, entwässerten sie in der aufsteigenden Alkoholreihe und deckten sie in Caedax ein.

Untersucht wurden die kollagenen Fasern des Coriums und der Leber. Die Hautpräparate stammten aus Probeexcisionen von stationären Patienten der Medizinischen Klinik; ausserdem entnahmen wir Haut- und Leberstückchen bei Autopsien+). Ferner untersuchten wir das Hautkollagen einiger Tiere.

2. Die Messung im einzelnen

Zur quantitativen Erfassung der EBNERschen Phenolreaktion bedienten wir uns des Faktors $\frac{a+b}{a}$, den MISSMAHL angab (s.S.26). Je stärker die Reaktion ablief, umso höher musste der Faktor werden. Wie massen in jedem Fall bei 12 bis 18 Fasern in verschiedenen Schnitten die Doppelbrechung vor und nach der Phenoleindeckung und errechneten für jede Einzelmessung den Faktor $\frac{a+b}{a}$. Den Mittelwert dieser Faktoren gaben wir als den bezeichnenden Faktor des betreffenden Falles an.

Als Beispiel möge die Bestimmung unseres Faktors bei einer Rinderhaut dienen:

Gangunterschied in Wasser (a) in mμ	Gangunterschied in Phenol (b) in mμ	Faktor $(\frac{a+b}{a})$
45,0	27,0	1,6
56,0	35,5	1,6
27,0	12,0	1,5
52,5	32,0	1,6
46,5	40,0	1,8
57,5	42,0	1,7
66,0	46,5	1,7
49,0	37,5	1,8
119,0	78,0	1,6
130,0	75,0	1,6
58,5	33,5	1,6
176,0	109,5	1,6
	Mittelwert:	1,64

+) Diese Präparate wurden uns vom Pathologischen Institut der Universität Tübingen freundlicherweise überlassen.

Dieser Mittelwert ist gemeint, wenn wir im folgenden vom Faktor des Kollagens einer Haut oder Leber sprechen.

Da die Ablesung bei den Kompensatoren nur auf eine Stelle nach dem Komma möglich ist, rundeten wir die Einzelfaktoren ebenfalls auf eine Stelle nach dem Komma. Um die Durchschnittswerte der verschiedenen Fälle besser differenzieren zu können, erschien es uns aber günstig, bei diesen noch die zweite Dezimale anzugeben.

IV. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Streubreite der Messmethode

Um die Streubreite der Messmethode zu ermitteln, bestimmten wir an einem Hautpräparat zehnmal den Faktor aus je 10 Einzelmessungen. Es ergaben sich folgende Mittelwerte:

1,56	1,60	1,59	1,56	1,54
1,57	1,56	1,60	1,55	1,56

Die 100 Einzelmessungen verteilten sich so:

Es kamen vor	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	
in	9	33	39	18	1	Fällen .

2. Einfluss der Vorbehandlung auf die Phenolreaktion

Fixieren in höher konzentriertem Formalin verändert die Stärke der positiven Doppelbrechung nicht. Der Gangunterschied der negativen Doppelbrechung dagegen wird umso grösser, je konzentrierter die Formalinlösung ist und je länger das Präparat darin liegt: Unser Faktor erhöht sich also. Wir führten zwei Messreihen durch: Haut von einem gesunden jungen Menschen und von einem Schwein wurden wie gewohnt in 4-proz. Formalin fixiert, der Faktor wurde bestimmt; anschliessend wurden die Präparate in 40-proz. Formalin eingelegt. In wechselnden Zeitabständen fertigten wir Schnitte an und bestimmten den Faktor. Die Skizze (Abb. 4 a) zeigt seinen Anstieg bis zu einem Grenzwert, der nach 2 Tagen erreicht wurde. Durch Auswaschen der Fasern in destilliertem Wasser liess sich der Faktor praktisch nicht vermindern.

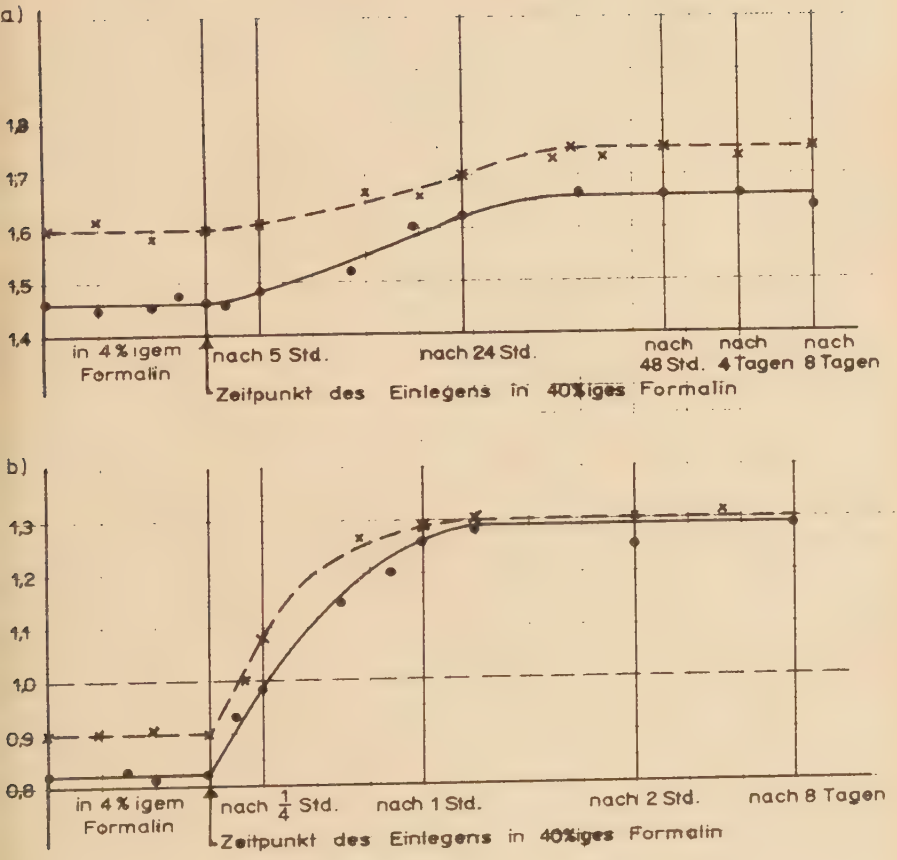


Abb.4. Anstieg des Faktors durch höher konzentriertes Formalin.

a) bei Eindecken mit Phenol
b) bei Eindecken mit Resorcin

Die Zeitmarkierungen erfolgen nicht linear.
Die durchgezogenen Linien bezeichnen die Werte der menschlichen Haut, die unterbrochenen die der Schweinehaut.

Eine ähnliche Verstärkung der Phenolreaktion bewirkte Temperaturerhöhung. Wir bestimmten bei verschiedenen Häuten - deren Faktor wir schon kannten - die positive Doppelbrechung in Wasser, liessen die Schnitte dann antrocknen und erhitzten sie 15 Minuten auf ca. 50-55°. Dabei trat noch keine wesentliche Schrumpfung ein, denn die Schrumpftemperatur zumal der trockenen Faser liegt viel höher (s.S.16), ausserdem konnten wir die von SANTOS (s.S.22) beschriebenen dunklen Streifen noch nicht beobachten; vor allem blieb der Gangunterschied der Doppelbrechung praktisch gleich. Dann deckten wir wie üblich in Phenol ein und massen die negative Doppelbrechung. Nun erhielten wir höhere Faktoren:

in 4-proz. Formalin fixierte Haut von	Faktor bei Zimmertemperatur	Faktor bei Temperaturerhöhung
Mensch, m., 70-jährig	1,50	1,66
Mensch, m., 16-jährig	1,53	1,72
Rind	1,59	1,73
Ratte	1,50	1,69

Aus diesen Veränderungen des Faktors ergibt es sich, dass man die Formalinkonzentration genau gleichhalten muss, wenn die Ergebnisse vergleichbar sein sollen. Ebenso darf sich die Temperatur nicht ändern. Wir standartisierten darum unsere Bedingungen auf 4-proz. Formalin und Zimmertemperatur.

Wenn 24 Stunden Fixierdauer erreicht waren, erwies sich weiteres Verweilen der Präparate im Formalin als gleichgültig. Ebenso waren geringe Schwankungen in der Phenolkonzentration ohne Einfluss auf die Reaktion; das ist verständlich, da unsere Konzentration die geforderte (s.S.24) weit übersteigt. Darum ist trat auch praktisch sofort nach dem Eindecken die volle Reaktionsstärke ein.

Wir erfassen mit der EBNERschen Reaktion nur den Anteil an Phenol, der gerichtet eingelagert ist. Wenn alle Anlagerungsmöglichkeiten erschöpft sind, kann ein Überschuss an Phenol die Reaktion nicht mehr beeinflussen. Nach Erreichen der Sättigung sind also Schwankungen in der Menge des angewandten Phenols belanglos.

Wir stellten auch Versuche mit dem zweiwertigen Phenol Resorcin an, dem meta-Dihydroxybenzol. Damit ergaben sich bei unserem Vorgehen keine befriedigenden Ergebnisse. Die erzielte negative Doppelbrechung war so schwach, dass das Wiederauffinden der Fasern manchmal schwierig war. Oft erfolgte auch nur eine Abschwächung der positiven Doppelbrechung. Die Parallelität der Resorcin- und Phenolfaktoren bei verschiedenen Häuten war nicht eindeutig.

Erhitzen vor dem Eindecken mit Resorcin erhöhte auch hier den Faktor wesentlich (von 0,9 auf 1,2 - 1,3). Auch konzentriertes Formalin liess die Reaktionsstärke zunehmen (Abb.4 b). Aus den Kurven ist zu ersehen, dass hier der Endwert schon im Verlauf der ersten Stunde erreicht wird. Wenn man aber die Schnitte in destilliertem Wasser auswäscht, bevor man sie in Resorcin eindeckt, sinkt der Faktor von jeder Stufe auf den Ausgangswert ab. Dazu sind für die menschliche Haut 15 Minuten, für die Schweinehaut 1-2 Stunden Einlegen in Wasser nötig.

3. Untersuchungen in farbigem Licht

Wir führten einige Messungen in monochromatischem Licht durch. Die Faktoren waren bei allen Wellenlängen gleich und stimmten auch mit denen in farblosem Licht überein:

	Farblos	620	580	540	500	450 [mμ]
Faktor (m., 66-jähr.)	1,53	1,50	1,53	1,52	1,53	1,51
Faktor (m., 20-jähr.)	1,50	1,53	1,50	1,53	1,51	1,53

4. Untersuchungen am Kollagen verschiedener Tierarten

Wir untersuchten das Hautkollagen einiger Tiere und fanden folgende Faktoren:

Schwein	I	1,60
	II	1,70
	III	1,62
Rind	I	1,59
	II	1,53
	III	1,64
Schaf	I	1,56
	II	1,49
	III	1,53
Ratte	I	1,50
	II	1,60
Maus	I	1,63
	II	1,59
	III	1,63
Huhn		1,53
Frosch	I	1,40
	II	1,38
	III	1,40
	IV	1,38
Schellfisch	I	1,26
	II	1,17
Regenwurm	I	0,68
	II	0,59
	III	0,56
Schnecke	I	0,65
	II	0,53
	III	0,48

Der Faktor nimmt in der aufsteigenden Tierreihe deutlich zu.

5. Untersuchungen am Kollagen des menschlichen Coriums

a) Das Kollagen der Erwachsenen

Wir bestimmten den Faktor zunächst bei 26 Erwachsenen und fanden folgende Ergebnisse:

Nr.	Geschlecht	Alter	Krankheit bzw. Todesursache	Faktor
1	m	66	Apoplexie	1,54
2	w	46	Collum-Ca	1,57
3	m	64	Ösophagus-Ca	1,53
4	w	74	Herzödeme	1,51
5	m	16	Urämie, Ödeme	1,53
6	m	32	Chronische Pankreatitis	1,58
7	w	27	Magen-Ca	1,53
8	w	62	Herzversagen, Kachexie	1,49
9	m	29	Appendicitis	1,56
10	m	70	Ileus; Arteriosklerose	1,53
11	w	62	Myxödem	1,51
12	m	70	Herzversagen	1,53
13	w	54	Nierenversagen	1,51
14	m	76	Pneumonie	1,54
15	m	70	Diabetes mellitus	1,50
16	m	77	Herzvitium	1,53
17	m	65	Nephrotisches Syndrom	1,55
18	w	82	Unfall	1,53
19	m	20	Unfall; Kachexie	1,50
20	w	58	Herzversagen, Ödeme	1,52
21	m	54	Porphyrie	1,53
22	m	80	Unfall	1,52
23	w	40	Hypophyseninsuffizienz nach Therapie	1,53
24	m	57	Panmyelopathie	1,51
25	w	33	Unfall	1,53
26	m	57	Hämochromatose	1,52

Bei einigen Autopsiefällen wurden Hautstücke verschiedener Körpergegenden untersucht:

			Faktor		Faktor
w.,	62-jähr.	Bauch	1,50	Oberschenkel	1,48
m.,	70-jähr.	Bauch	1,53	Unterschenkel (mit massivem thrombotischem Ödem)	1,53
m.,	8 Monate	Bauch	1,56	Oberarm	1,55
m.,	77-jähr.	Bauch	1,53	Brust	1,54

b) Das Kollagen der Säuglinge

Wir untersuchten die Haut von 12 Säuglingen:

Nr.	Geschlecht	Alter	Todesursache	Faktor
1	m.	3 Tage	Mongoloidismus	1,60
2	m.	1 Tag	Erythroblastose	1,57
3	m.	1 Tag	Asphyxie	1,58
4	m.	10 Std.	"	1,53
5	m.	-	Totgeburt (Placentaschaden)	1,59
6	m.	4 Tage	Mongoloidismus	1,56
7	m.	8 Mon.	Hyperpyrexie nach Pockenschutzimpfung	1,55
8	w.	-	Totgeburt	1,60
9	m.	1 Tag	Schädigung durch Beckenendlage	1,56
10	w.	2 Tage	Asphyxie	1,60
11	m.	-	Frühtotgeburt	1,51
12	m.	-	Totgeburt	1,56

c) Das Kollagen Kachektischer

Wir untersuchten 2 Fälle mit starker Kachexie:

m.	90-jähr.	1,44
w.	56-jähr.	1,41

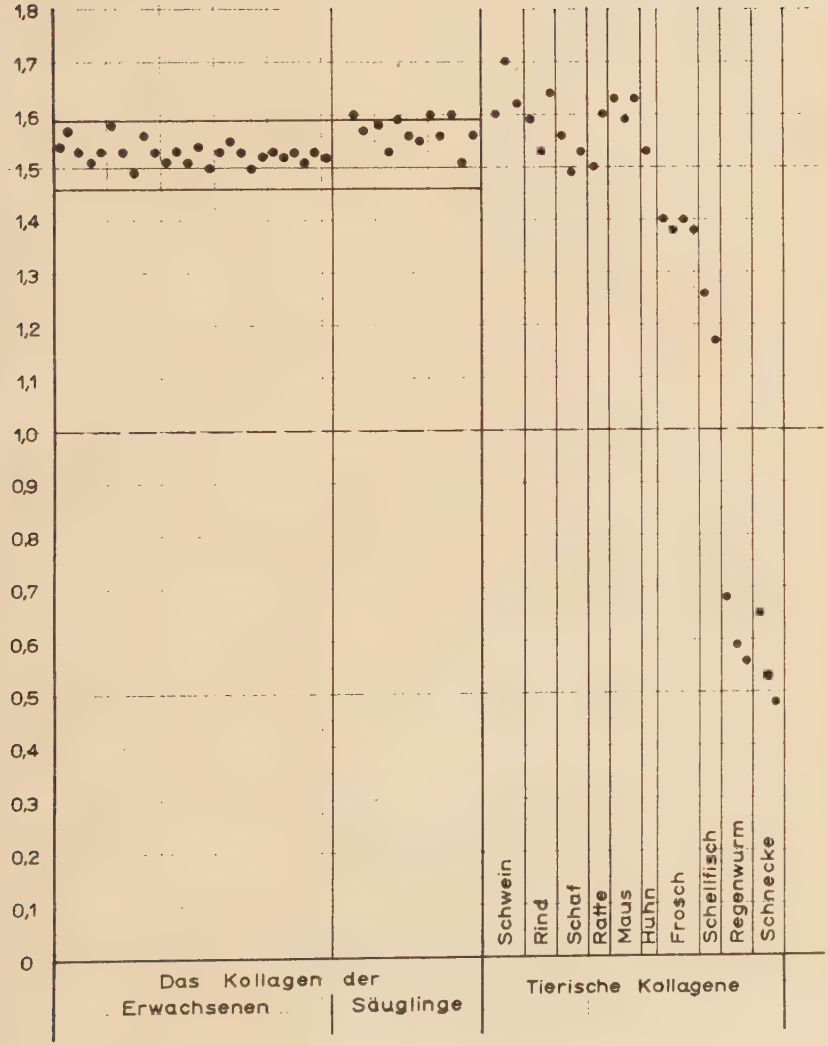


Abb.5. Der Faktor des Hautkollagens von Erwachsenen, Säuglingen und Tieren.
Der schraffierte Bezirk entspricht dem 3σ-Bereich des Hautkollagens Erwachsener.

d) Das Kollagen von Patienten mit Funktionsstörungen der Nebennierenrinde

Wir untersuchten 8 Fälle von klinisch gesichertem M. Addison. Es ergaben sich folgende Faktoren:

Fall	Klinische Befunde siehe Krankenblatt Nr.	Faktor
1	4 701	1,65
2	8 079	1,68
3	9 056	1,71
4	8 764	1,61
5	6 803	1,65
6	9 120	1,85
7	4 753	1,75
8	9 506	1,64

Bei den Fällen 1-3 wurde nach einiger Zeit eine neue Excision vorgenommen. Wir fanden bei

Fall 1 nach 1 1/2-wöchiger Therapie einen Faktor von 1,55
" 2 " 2 1/2- " " " " " 1,53
" 3 " 3- " " " " " 1,49

Das Hautkollagen von 2 Patienten mit Akromegalie wurden ebenfalls untersucht (Krankenblätter Nr. 2731 und 8732). Bei beiden Fällen betrug unser Faktor 1,62.

Ein Patient mit Hypophyseninsuffizienz (Krankenbl. Nr. 8875) ergab einen Faktor von 1,60 .

Schliesslich erhielten wir noch eine Probeexcission eines Kranken mit M. Cushing (Krankenbl. Nr. 149). Wir fanden einen Faktor von 1,50.

e) Das Kollagen eines Patienten mit Lupus erythematodes

Hier ergab sich ein Faktor von 1,60.

6. Untersuchungen am Kollagen der menschlichen Leber

An Schnitten von 21 Lebern stellten wir die EBNERsche Reaktion an und bestimmten den Faktor. Wir erhielten folgende Ergebnisse:

Nr.	Geschlecht	Alter	Krankheit bzw. Todesursache	Faktor
1	m.	59	Zirrhose	1,47
2	w.	72	Apoplexie, Herzversagen	1,54
3	m.	25	Tetanus	1,51
4	w.	70	Magen Ca	1,55
5	w.	84	Peritonitis	1,49
6	w.	50	Hirntumor	1,46
7	m.	54	Urämie, Herzversagen	1,53
8	m.	70	Diabetes, Zirrhose	1,48
9	m.	62	Magenperforation	1,50
10	m.	45	Zirrhose	1,56
11	w.	43	Urämie	1,58
12	m.	82	Kreislaufversagen	1,51
13	w.	72	Kachexie, Kreislaufversagen	1,56
14	w.	32	Hirntumor	1,51
15	m.	76	Ileus	1,57
16	w.	76	Apoplexie	1,45
17	w.	53	Collum Ca	1,55
18	m.	51	Septische Cholangitis	1,48
19	m.	32	Chronische Pankreatitis, Akute Leberdystrophie	1,50
20	m.	50	Herzversagen	1,58
21	m.	2 Tage	Asphyxie	1,60

In 3 Fällen wurde auch der zugehörige Hautfaktor ermittelt.

Es ergab sich bei Nr. 8 1,50
" 19 1,58
" 21 1,60

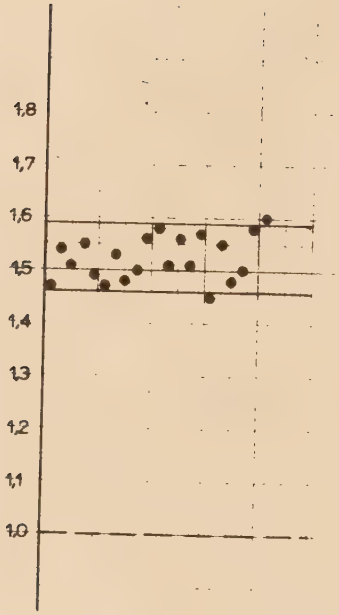


Abb. 6

Der Faktor des menschlichen Leberkollagens.

Der letzte Wert entstammt einer Säuglingsleber.

Der schraffierte Bezirk entspricht dem 3 σ -Bereich des Hautkollagens Erwachsener.

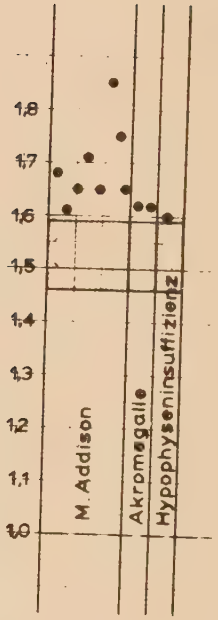


Abb. 7

Der Faktor des Hautkollagens bei Unterfunktion der Nebennierenrinde.

Der schraffierte Bezirk entspricht dem 3 σ -Bereich des Hautkollagens Erwachsener.

7. Färbung mit polychromem Methylenblau

Von allen Präparaten wurden Schnitte mit polychromem Methylenblau angefärbt. Jedesmal konnte die Dispersion der Doppelbrechung, die MISSMAHL[48] angab, bestätigt werden.

Beispiele:

	Farblos	620	580	540	500	460	440 [mμ]
Gangunterschied (Haut, m 76-jähr.)	78	25	58	70	72	75	51 [mμ]
Gangunterschied (Leber, w 72-jähr.)	24,4	-	4,5	11,8	13,9	10,2	8,5 [mμ]
Gangunterschied (Regenwurm, Cuticula)	27	-	2	11,5	23,5	20	6 [mμ]
Gangunterschied (Schnecke, Haut)	14	-	-	-	11,5	15,5	11,5 [mμ]

Alle Präparate zeigten im weissen und im farbigen Licht über alle Wellenlängen schwachen negativen Dichroismus.

Die Kollagenfasern der Regenwurmcuticula leuchteten beim Kompensieren ganz schwach braunrot auf; hier war also die rote anomale Polarisationsfarbe des polychromen Methylenblau angedeutet vorhanden. Das Kollagen der Schnecke zeigte allerdings keine anomale Polarisationsfarbe. Der negative Dichroismus war beim Regenwurm und bei der Schnecke im Grün am stärksten, er liess sich aber bis ins Orange hinein verfolgen. Die Dispersin der Doppelbrechung entsprach beim Regenwurm der gewöhnlichen, bei der Schnecke konnten wir Doppelbrechung überhaupt nur im Blau und Grün nachweisen (s. Tabelle).

V. Diskussion der Ergebnisse

1. Die Messgenauigkeit unserer Methode

Aus den Messreihen (s.S.29) ergibt sich für die Mittelwerte ein Durchschnitt von 1,57 und ein $3\sigma = 0{,}06$. Unsere Methode erlaubt also recht zuverlässige Messungen. Dabei stellten wir für jeden Durchschnittswert nur 10 Einzelmessungen an, die wir alle an einem Schnitt vornahmen; wir erfassten also die ungünstigsten Bedingungen.

2. Beitrag zur Theorie der EBNERschen Phenolreaktion

Nach SCHMIDT (s.S.25) lagert sich das Phenolmolekül an die hydrophilen Gruppen im Eiweiss an. Welche Gruppen kommen dafür in Betracht?

Zuerst muss man wohl an die Peptidbindung denken. An deren CO kann sich ein Phenolmolekül als Alkohol durch Wasserstoffbrückenbildung anlagern (Abb.8 a). In der Skizze ist die Doppelbindung der Ketogruppe aufgerichtet. Die meisten der CO-Gruppen im Kollageneiweiss sind zwar durch H-Brücken von den benachbarten NH- und OH-Gruppen besetzt (s.S.11), aber Phenol kann diese H-Brücken zerstören (GRASSMANN in GROSS[25]).

Die NH-Gruppe der Peptidbindung bietet wohl eine gute Anlagerungsmöglichkeit für das Phenol, das nun als schwache Säure wirkt (Abb.8 b). - Eine ähnliche Bindung lässt sich am freien NH_2 basischer Aminosäuren vermuten (Abb.8 c).

Als Alkohol kann sich das Phenol wohl auch in der Art einer Esterbindung an die Carboxylgruppen der sauren Aminosäuren anlagern (Abb.8 d).

Es ist auffällig, wie die Stärke der Phenolreaktion bei verschiedenen Tieren dem von GUSTAVSON (s.S.17) angegebenen Oxyprolingehalt parallel geht. Während sämtliche untersuchten Säugetiere und das Huhn Faktoren zwischen 1,5 und 1,7 haben, finden wir beim Frosch knapp 1,4 und beim Schellfisch, der als Kaltwasserfisch den geringsten Oxyprolingehalt der Wirbeltiere zeigt, Werte um 1,2. Vermutlich stellt die OH-Gruppe des Oxyprolin eine besonders günstige Möglichkeit zur Anla-

gerung von Phenol dar; dafür käme ihr die aus der Eiweiss-kette herausragende Stellung bei dennoch geringer Beweglich-keit zustatten. Wahrscheinlich muss man sich eine Art Wasser-stoffbrücke vorstellen. Für eine Ätherbindung werden wohl die energetischen Bedingungen nicht erfüllt sein.

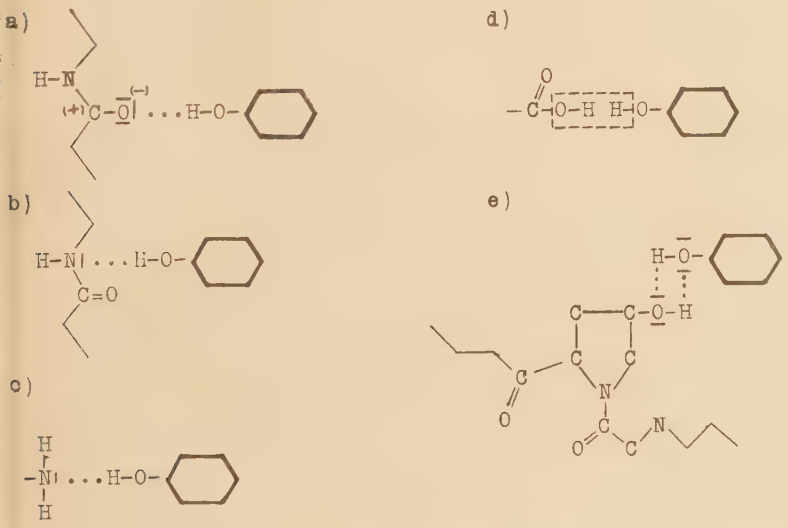


Abb.8. a-e) Anlagerungsmöglichkeiten des Phenols am Eiweiss.

Wie können wir uns den Einfluss des hochkonzentrierten Formalins erklären? Nach ZEIGER lagert es sich unter Wasser-abspaltung an sekundäre Alkoholgruppen und an freie NH_2-Gruppen

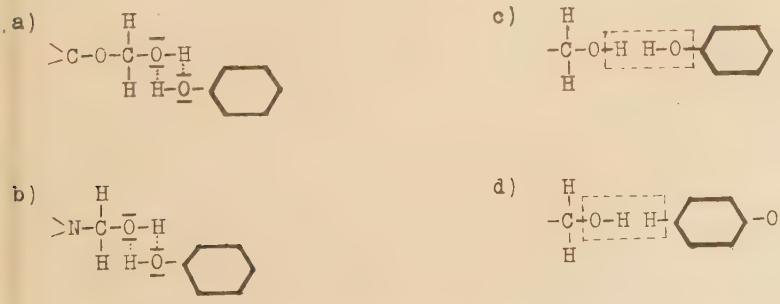


Abb.9 a-d) Anlagerungsmöglichkeiten des Phenols am Formalin.

an (s.S.20). Auch an der sekundären Aminogruppe wäre eine solche Anlagerung denkbar. Zwischen so entstandenen OH-Gruppen und der des Phenols können nun wieder Wasserstoffbrücken entstehen (Abb.9 a und b).

HOLCZINGER (s.S.20) glaubt, dass teilweise auch die freie Aldehydgruppe des Formalins am Eiweiss bestehen bleibt. Daran kann sich das Phenol im Sinne einer Kondensation anlagern.

Als Kondensation lässt sich natürlich auch die Reaktion mit der OH-Gruppe vorstellen; unter Wasseraustritt entstehen dann ziemlich stabile Verbindungen (Abb.9 c und d). Dabei könnte die OH-Gruppe des Phenols auch frei bleiben (Abb.9 d) und für weitere Kondensation bereitstehen.

Neben diesen chemischen Wirkungen des Formalins kommen auch strukturelle Einflüsse in Betracht. Das Formalin wirkt quervernetzend und hemmt die BROWNsche Molekularbewegung. So begünstigt es wohl die Ausbildung der Blättchensäulen des Phenols. - Im gleichen Sinne kann auch das Oxyprolin wirksam werden. Seine stabilisierende Wirkung auf die Proteinkette erlaubt wahrscheinlich eine vollkommenere Ordnung der Phenolpolymerisate.

An getrockneten Fasern fanden KÜNTZEL u. SCHWANK (in SCHMIDT[72]) eine etwas stärkere Phenolreaktion. Bei unserem Hitzeversuch spielte die Trocknung bestimmt eine Rolle. Aber daneben muss man auch an bisher nicht fassbare Denaturierung denken; vielleicht entsteht sie teilweise durch starkes Austrocknen. Nach NETTER[53] kann Denaturierung schon durch sehr milde Einwirkung geschehen; sie beschränkt sich dann auf bestimmte reaktive Gruppen. Wir stellen uns vor, dass dabei ein Teil der H-Brücken geöffnet wird. Nun gelingt es dem Phenol noch leichter, sich an ihre Stelle zu setzen.

Nach SCHMIDT können zweiwertige Phenole durch ihre freie OH-Gruppe wieder in das Lösungsmittel zurücktreten und wirken darum schwächer. Das bestätigte sich in unseren Untersuchungen. Unsere Schnitte waren ja nicht ganz trocken. So konnten mehr oder weniger Moleküle ins Lösungsmittel zurückkehren. Die Unregelmässigkeit des Reaktionsausfalls lässt sich vielleicht durch lokale Unterschiede im Wassergehalt erklären.

Beim Erhitzen stieg der Faktor stark an; neben dem oben genannten Grunde bewirkte das beim Resorcin wohl die vollkommenere Trockenheit.

Beim Resorcin kehren die durch konzentriertes Formalin erhöhten Faktoren wieder zum Normalwert zurück, wenn man die Schnitte einige Zeit in Wasser auswäscht. Indessen bleibt beim einwertigen Phenol der Faktor auch nach dem Wässern praktisch gleich.

Für diesen Unterschied können wir im Augenblick noch keine sichere Erklärung geben. Möglicherweise setzt das Wässern - wohl vor allem durch Öffnen von Formalinbrücken - geringe Veränderungen in der Struktur des Kollagens (s.S.20). Diese Veränderungen mögen die Anlagerung des Resorcins empfindlicher stören als die des einwertigen Phenols. Weiterhin stellen wir uns vor, dass sich das zweiwertige Phenol an überschüssiges Formalin anlagert und so zu dem erhöhten Faktor führt. Wird nun das überschüssige Formalin durch Wässern entfernt, findet das zweiwertige Phenol keine Anlagerungsplätze mehr. Demgegenüber mag das einwertige Phenol an stabileren Plätzen sitzen, die vom Wässern nicht so stark betroffen werden.

Beim Kollagen des Regenwurms und der Schnecke gelingt keine Umkehr der positiven Doppelbrechung, ihre Faktoren bleiben unter 1. Aus den bisher genannten Bedingungen lässt sich das nicht erklären, zumal der Regenwurm mit 15 % den höchsten Oxyprolingehalt aller Tiere aufweist.

Nun gibt sezerniertes Kollagen zwar das weitwinklige Röntgendiagramm, nicht aber das engwinklige. Es besitzt also wohl eine Tripelhelix, unterscheidet sich aber in der feineren Struktur vom Kollagen der Wirbeltiere. Im Methylenblaupräparat konnten wir angedeutet die anomale Polarisationsfarbe nachweisen (s.S.40); es liegen (nach UNSELD[79]) offenbar andere Strukturverhältnisse vor, die dem Farbstoff eine geordnetere Einlagerung erlauben.

Welcher Art diese strukturellen Unterschiede zwischen dem sezernierten Kollagen und dem der Wirbeltiere sind, lässt sich aus den bisherigen Kenntnissen über den Feinbau des Kollagens nicht schliessen. Wir vermuten, dass sie den Ablauf

der EBNERschen Phenolreaktion hemmen.

Die oben von uns diskutierten Punkte können also nur einen Teil der Bedingungen für die Phenolreaktion darstellen. Sie hängt auch von bisher unbekannten Verhältnissen der Feinstruktur der kollagenen Faser ab. Es werden weitere Erkenntnisse über die molekulare Struktur des Kollagens notwendig, wenn wir sichere und umfassende Vorstellungen über den Ablauf der EBNERschen Reaktion erhalten wollen.

3. Das menschliche Kollagen

a) Das normale Kollagen des Erwachsenen

Der Faktor zeigt bei den verschiedensten klinischen Krankheitsbildern eine überraschende Konstanz. Er liegt bei unseren Fällen zwischen 1,49 und 1,58. Als Durchschnittswert ergibt sich 1,53 (1,528), als 3σ-Wert 0,063. Wir können also mit grosser Sicherheit annehmen, dass 95 % aller normalen kollagenen Fasern des menschlichen Coriums einen Faktor zwischen 1,464 und 1,591 besitzen. Die Entnahmestelle am Körper ist dabei gleichgültig.

Das menschliche Leberkollagen kommt mit einem Durchschnittsfaktor von 1,52 (1,519) dem der Haut sehr nahe; es ergibt sich ein 3σ-Wert von 0,123, damit ein etwas grösserer Streubereich (1,397 - 1,643). Das mag von der geringeren Anzahl der untersuchten Fälle herrühren oder durch den lebhafteren Stoffwechsel der Leber bedingt sein, dessen Veränderungen das Leberkollagen eher ausgesetzt sein wird als das der Haut.

Wir kommen zu der Überzeugung, dass sich bei standartisierten Bedingungen ein für das normale menschliche Kollagen bezeichnender Faktor sichern lässt. Dabei erhält das leicht erreichbare Hautkollagen besondere Bedeutung.

b) Das Kollagen der Säuglinge

Unsere untersuchten Säuglingskollagene zeigen im ganzen etwas höhere Faktoren; sie streuen zwischen 1,51 und 1,60.

Wir erhalten einen Durchschnittsfaktor von 1,57 (1,568), einen 3σ-Wert von 0,086, also einen statistischen Streubereich von 1,482 - 1,653.

Um festzustellen, ob das Säuglingskollagen tatsächlich einen höheren Faktor besitzt als das der Erwachsenen, stellten wir einen t-Test an. Bei einem $t = 4,250$ fanden wir $p < 0,001$; die Differenz ist also gesichert.

Die stärkere Phenolreaktion der Säuglinge lässt sich leicht erklären mit der geringeren Anzahl an H-Brücken (s.S.18), sodass sich das Phenol leichter anlagern kann. Auch das Formalin findet bessere Anlagerungsbedingungen. Wahrscheinlich wäre der Faktor des Säuglingskollagens noch höher, wenn nicht das zu 10 % enthaltene Prokollagen, das natürlich am meisten freie Gruppen besitzt, im Phenol löslich wäre.

c) Verkleinerung des Faktors bei Erwachsenen

In 2 Fällen fanden wir beim Hautkollagen einen Faktor, der deutlich niedriger lag als bei den anderen Häuten. Diese Patienten waren unter starker Kachexie zugrunde gegangen. Es ist zu bemerken, dass auch die beiden niedrigsten Faktoren der Normalreihe (1,49 und 1,50) von Menschen stammen, die stark kachektisch waren.

Man muss sich vorstellen, dass bei allgemeinem körperlichen Zerfall und bei bestimmten Stoffwechselstörungen das Kollagen pathologisch verändert werden kann. Dabei müssen solche Störungen wohl nicht immer klinisch erkennbar sein.

Vielleicht entsprechen solche Veränderungen den von GUSTAVSON (s.S.18) vermuteten pathologischen Einlagerungen; sie können unter Umständen dem Phenol die Ansatzpunkte versperren. BROWN u. CONSDEN (s.S.18) sehen im Anstieg der Schrumpftemperatur im Greisenalter ebenfalls degenerative Veränderungen; Wärmestabilitätszuwachs ist aber auch ein Ausdruck vermehrter Quervernetzung, also des Verschlusses freier reaktionsfähiger Gruppen.

Denkbar wäre es auch, dass diese Kranken durch bisher unbekannte Schäden ihrer Zellfermente unfähig geworden sind, ein Kollagen der spezifischen feinbaulichen Ordnung herzustellen.

Endlich ist anzunehmen, dass überhaupt weniger Fasern neu

gebildet werden, und damit der Anteil der Eiweissketten mit vielen freien Gruppen abnimmt.

d) Erhöhung des Faktors bei Erwachsenen

Alle unsere Fälle mit Unterfunktion der Nebennierenrinde zeigten eine Erhöhung ihres Kollagenfaktors. Der Anstieg entspricht bei den verschiedenen Patienten etwa der Schwere der klinischen Erscheinungen. Besonders deutlich wird dies bei den Addisonpatienten, deren Faktor nach klinisch erfolgreicher Therapie zur Norm zurückkehrte.

GOLDSMITH u. ROSS[18)] berichten über Desorganisation der Peridontalmembran bei Ratten durch Cortisongaben. Die mikroskopische Ordnung der Kollagenfasern und Fibrillen war weitgehend aufgelöst und die Faserneubildung herabgesetzt oder aufgehoben. - Dazu passt, dass unser Cushingpatient mit einem Faktor von 1,50 an der unteren Grenze der Norm liegt. Desorganisation erschwert wohl die Phenolanlagerung. Allerdings ist die Abweichung bei unserem Cushingpatienten nicht so eindeutig wie beim M. Addison.

Wir stellen uns vor, dass umgekehrt eine Abnahme des Cortisolspiegels zu besonders vollkommen geordnetem Feinbau der Fasern führt. Man darf auch ungehemmte Neubildung von Fasern erwarten, der höhere Anteil an wenig quervernetzten jungen Fibrillen verstärkt dann die Phenolreaktion. - Allein schon im mikroskopischen Bild der Addisonhaut erscheinen die Fasern meist dicker, geordneter und dichter gebündelt. Gerade die besonders kräftigen und glatten Faserbündel ergeben die höchsten Faktoren.

Die überraschend schnelle Normalisierung der Addison-Faktoren unter der Therapie kommt wohl hauptsächlich daher, dass das bisher laufend neu gebildete Kollagen (Prokollagen) nun in reifes Kollagen umgewandelt wird; die Neubildung steht aber unter der Cortisontherapie still. OREKHOVITSCH (s.S.14) gab entsprechend an, dass der Übergang seines Prokollagen in Kollagen 2-3 Wochen dauert. Wenn doch Kollagen neu entsteht, dann erhält es nicht mehr die übermässig geordnete Struktur.

Schliesslich war auch beim Lupus erythematodes der Faktor erhöht. Wir können uns allerdings bisher nicht erklären, auf welche Weise es dazu kommt.

Auf Grund dieser Ergebnisse sind wir noch nicht in der Lage, eine umfassende Vorstellung über die Grundlagen der EBNERschen Phenolreaktion und ihrer Veränderungen zu gewinnen. Die Reaktion verspricht aber, auf einfache Weise bestimmte Strukturverhältnisse in der kollagenen Faser zuverlässig aufzuzeigen. Wir halten es darum für angebracht, ausgedehnte Untersuchungen bei allen in Frage kommenden Erkrankungen anzustellen und schlagen dafür vor allem endokrine Störungen und die Krankheiten vor, die unter der Bezeichnung „Kollagenosen" zusammengefasst wurden.

Zusammenfassung

1. In einer Literaturübersicht berichten wir über Ergebnisse der Kollagenforschung, wobei die EBNERsche Phenolreaktion besondere Berücksichtigung findet.
2. Wir versuchen, mit Hilfe des MISSMAHLschen Faktors $\frac{a+b}{a}$ die EBNERsche Phenolreaktion quantitativ zu erfassen und kommen dabei zu folgenden Ergebnissen:
   a) Die EBNERsche Phenolreaktion lässt sich unter den von uns angegebenen Bedingungen quantitativ auswerten.
   b) Beim gesunden erwachsenen Menschen beträgt der Faktor $1{,}53 \pm 0{,}063$ (3G-Bereich).
   c) Das Kollagen der Säuglinge ergibt einen statistisch gesichert höheren Faktor als das der Erwachsenen.
   d) Bei Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz finden wir Faktoren, die in allen Fällen über unserem Normwert liegen.
   Nach Behandlung mit Steroiden kehrt der Faktor beim M.Addison innerhalb 3 Wochen zur Norm zurück.
3. Wir untersuchen die Bedeutung unserer Ergebnisse und ihre Beziehung zur Theorie der EBNERschen Phenolreaktion.

Herrn Oberarzt Dozent Dr. M i s s m a h l

danke ich herzlich für das Überlassen des Themas und für seine freundliche Unterstützung.

Literaturverzeichnis

1) Ambrose, E.J. u. A.Elliott, Infra-red-spectra and structure of fibrous proteins, Proc.Roy.Soc. London A 206, 206-219 (1951)

2) Astbury, W.T., Introduction, Connective Tissue, A Symposium, Blackwell Oxford 1957, 7-11

3) Banga, J. u. J.Balo, The Struct.and chem.compos.of connect. tiss., Connective Tissue, A Symposium, Blackwell Oxford 1957, 254-263

4) Bear, R.S., Long X-ray diffraction spacings of collagen, J.Am.Chem.Soc. 64, 727 (1942)

5) - The structure of collagen fibrils, Adv.Prot.Chem. 7, 69-160 (1952)

6) - u. R.S.Morgan, The Composition of bands and interbands of coll.fibr., Connective Tissue, A Symposium, Blackwell Oxford 1957, 321-333

7) Bergmann, M. u. C.Niemann, On blood fibrin. A contribution to the problem of prot.struct., J.Biol.Chem. 115,77 (1936)

8) Bowes, J.H., R.G.Elliott u. J.A.Moss, The composition of some protein fractions isolated from bovine skin, Connective Tissue, A Symposium Blackwell Oxford 1957, 264-280

9) Braun-Falco, O., Über Untersuchungen d.Hautbindegewebes mit der Hale-PAS-Reaktion unter normalen Bedingungen u. bei Erkrankungen d. Hautbindegewebes, Acta histochem. 5, 10-24 (1956)

10) Brown, P.C. u. R.Consden, Variation with age of shrinkage temperature of human collagen, Nature (London) 181, 349-350 (1958)

11) Clark, G.L., Parker,E.A., J.A.Schaad u. W.J.Warren, zit. bei Bear[5]

12) Cowmann u. Mc.Gavin 1955, zit. bei Astbury[2]

13) Crick,F.H. u.A.Rich 1955, zit. bei Astbury[2]

14) v.Ebner, V. 1884, 1897), zit. bei W.J.Schmidt[72]

15) Elden,H.R., Effect of cross linking by formaldehyde on the contraction-relaxation of rat tail tendon. Nature (London) 183, 332-333 (1959)

16) Engel,J., Untersuchung des Mechanismus der Denaturierung u. Renaturierung von löslichem Kollagen mit der Lichtstreuungsmethode. Hoppe Seylers Z.physiol.Chem. 325,287-288(1961

17) Ewald,A., Beiträge zur Kenntnis des Collagens II, Z.physiol. Chem. 105, 135-157 (1919)

18) Goldsmith,E.D. u. L.Ross, A histochem.and histolog.study of the effect of cortisone on the lower incisors of fetal an post-natal rats. Acta Endocrin. 22, 23-41 (1956)

19) Gössner,W., Vergleichende histochem. Untersuchungen über die Proteinkomponente von Amyloid, Hyalin und Kollagen. Zschr.f.Histochemie 2, 199-216 (1961)

20) Grassmann,W., W.Hofmann, K.Kühn, H.Endres, H.Hörmann u. R.Wolf Electronmicroscopical and chemical studies of the carbohydrate groups of collagen, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 157-171

21) - K.Hannig, H.Endres, A.Riedel, Amino-acid sequences of Collagen. Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 308-320

22) - u. K.Kühn, Abbau des Kollagen u. Prokollagen mit Natriumperjodat und Phenyljodosoacetat, Hoppe Seylers Z.physiol. Chem. 301, 1-16 (1955)

23) Graumann,W., Die histochemische Periodatreaktion der Reticuli und Kollagenfasern, Acta histochem. 1, 116-126 (1954)

24) - Kohlenhydrathistochemie der Bindegewebsfasern, Acta histochem. 3, 226-242 (1956)

25) Gross,J., Studies on the fibrogenesis of collagen. Some properties of neutral extracts of conective tissue, Connecti Tissue Symposion Blackwell Oxford 1957, 45-61

26) Gustavson,K.H., Some new aspects of the stability and reactivity of collagens, Connective Tissue Symposion Blackwell Oxford 1957, 185-207

27) Hall,C.E., M.A.Jakus u. F.O.Schmidt, Electron mikroscope observations of collagen, J.Am.Chem.Soc. 64, 1234 (1945)

28) Hartmann,F., Neuere Ergebnisse der Bindegewebsforschung, Zschr.f.Rheumaforschung 17, 445-468 (1958)

29) Hermann,L., 1873, zit. bei Bear5)

30) Herzog,R.O. u. H.W.Gonnel, Weitere Untersuchungen an Naturstoffen und biologischen Strukturen mittels Röntgenstrahlen, Naturwiss. 12, 1153-1155 (1924)

31) Hirsch,G.Ch., Die Fliessbandarbeit in der exokrinen Pankreaszelle bei der Produktion von Enzymen, Naturwiss, 47, 25-35 (1960)

32) Holczinger,L., Bildung von Aldehydgruppen in formalinfixierten Geweben, Acta histochem. 6, 36-43 (1957)

33) Jackson,D.S., The formation and breakdown of connective tissue, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957,62-76

34) Jackson,S.F., Structure problems associated with the formation of collagen fibres in vivo, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 77-85

35) Jennison,M.W. 1945, zit. bei Bear[5)]

36) Katz,I.R. u. A.Weidinger, Die lyotrophe Reihe bei der Quellung und ihre Ausbreitung auf organische auch nicht ionisierende Substanzen, Biochem.Z. 259, 191-199 (1933)

37) Kratzky,O. u. A.Sekora 1943, zit. bei Bear[5)]

38) - , M.Ratzenhofer u. E.Schauenstein 1950, zit. bei Probst[63)]

39) Kühn,K., U.Hofmann u. W.Grassmann, Querstreifung und Periodat-Silberurotropin-Reaktion bei verschiedenen Kollagenarten, Zschr.f.Naturforsch. 11b, 9-10 (1956)

40) - , U.Hofmann u. W.Grassmann, Über die Verteilung der basischen Aminosäuren in der Tropokollagenmolekel, Naturwiss. 46, 512 (1959)

41) Letterer,E. zit. bei Kühn[40)]

42) Lindner,J., H.A.Graf v.Schweinitz u. G.Freytag, Reaktionsformen von Kollagenfasern, Acta histochem. 9,231-246(1960)

43) Lloyd,D.I. u. R.H.Marriott 1936, zit. bei Bear[5)]

44) Melnick,S.C., Occurrence of collagen in the phylum mollusca, Nature (London) 181, 1483 (1958)

45) Merker,H.-J., Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen, Zscht.Zellforsch.u.mikr.Anat. 53, 411-430 (1960)

46) Missmahl,H.-P., Bedeutung und Möglichkeiten der Polarisationsmikroskopie in der Medizin, Bericht der oberhess.Ges. f.Natur- u.Heilkunde zu Giessen. NF, Naturwiss.Abt. 27, 32-40 (1954)

47) - Nachweis gerichtet eingelagerter Lipoide in die reticuläre Faser u.neue Untersuchungen über das Verhalten der reticulären Faser im Krankheitsgeschehen, insbe-

sondere bei der Amyloidose. Habilitationsschrift 1958 Tübingen

48) Missmahl,H.-P., Die Beeinflussung des polarisierten Lichtes durch die Amyloidsubstanz, 1. Internationaler Kongress für Histochemie, Paris 1960 (im Druck)

49) Németh-Csóka,M., Untersuchungen über die kollagenen Fasern I.Teil, Acta histochem. 9, 231-246 (1959)

50) - II.Teil, Acta histochem. 12, (1961) 255-276

51) Nemetschek,Th., W.Grassmann u. U.Hofmann, Über die hochunterteilte Querstreifung des Kollagens, Z.Naturforsch. 10 b, 61-68 (1955)

52) Neuberger,A., Observation on the presence and metabolism of plasma proteins in skin and tendon, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 35-44

53) Netter,H., Denaturierung und Strukturumwandlung am Eiweiss, Acta histochem. Suppl.band I, 154-176 (1958)

54) Orekhovitsch,V.N. u. V.O.Shpikiter, Procollagens as biological precursors of collagen and the physio-chemical nature of these proteins, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 281-293

55) Palade,G.E. u. P.Siekevitz 1958, zit. bei Merker[45]

56) - 1956, zit. bei Merker[45]

57) Pauling,L. u. R.B.Corey, The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin groups, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 37, 272-281 (1951)

58) - u. R.B.Corey, Compound helical configuration of polypeptide chains structure of proteins of the α-keratin type, Nature (London) 171, 59-61 (1953)

59) Pernis,B., A.Bairati u. G.Frigerio, La ultrastruttura del tissiuto fibroialins della silicosi, La Medicina del chavoro 47, Fasc. 8-9 (1956)

60) Pfeiffer,H.H., Polarisationsmikroskopische Messungen an Kollagenfibrillen in vitro, Arch.f.exp.Zellforsch. 25, 92-100 (1943)

61) Piez,K.A. u. J.Gross, The amino acid composition of some fish collagens: The relation between composition and structure, J.biol.chem. 235, 995-998 (1960)

62) Pötz,L. u. Th.Nemetschek, Über die Querstreifung des Kollagens, Zentralbl.f.Mikroskop.Forsch.u.Meth. Wien 13,68 (1956)

63) Probst,A. u. M.Ratzenhofer, Zum Verhalten der Sehnenfibrillen während der Entwicklung, im höchsten Alter und unter pathologischen Bedingungen; über die Fibrillen im mesenchymalen Hyalin, Zschr.f.wissensch.Mikroskopie u.mikroskop.Technik 62, 183-190 (1955)

64) Quintarelli,G., Histochemistry of sialo-mucins in connective tissue, Zschr.f.Histochem. 2, 356-358 (1961)

65) Ramachandran,G.N. u. V.Sasisekharan, Structure of collagen, Nature (London) 190, 1004-1005 (1961)

66) Ratzenhofer,M. u. E.Schauenstein 1959, zit. bei Probst[63)]

67) Reed,R. u. K.M.Rudall 1948, zit. bei Bear[5)]

68) Reed,R., The architecture of the collagen fibril, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 299-307

69) Reed,R., M.J.Wood u. M.K.Keech, Helical nature of the collagen fibril. Nature (London) 177, 697-699 (1956)

70) Santos,P.S., H.S.Santos, G.A.Edwards, A.K.Hodge, P.Sawaya, Fine structure and chem.properties of animal connective tissue fibrils, Mem.Inst.Buntantam 27/1, 27-39

71) Scherrer,P. 1920, zit. bei Bear[5)]

72) Schmidt,W.J., Der Wandel der optischen Anisotropie bei topochemischen Reaktionen histologischer Strukturen. Bericht der oberhess.Ges.f.Natur- u.Heilkunde zu Giessen, NF, Naturwiss.Abt. 23, 56-85 (1947)

73) - Einiges über die Polarisationsoptik von Proteinstrukturen, Acta histochem. 4, 175-192 (1956)

74) - Instrumente und Methoden zur mikroskopischen Untersuchung optisch anisotroper Materialien mit Ausschluss der Kristalle, Handbuch d.Mikroskopie in der Technik I Teil 1, 149-315 (1956)

75) Schröder,W.A., L.M.Kay, J.Le Gette, L.Honnen u. F.C.Green 1953, 1954, zit. bei Grassmann[22)]

76) Schwarz,W., Morphology and differentiation of the connective tissue fibres, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 144-156

77) Schwarz,W., A.Jahnke u. M.Hofmann 1958, zit. bei Merker[45)]

78) Tomlin,S.G. u. C.R.Worthington, Low-angle X-ray diffraction patterns of collagen, Proc.Roy.Soc. Ser.A, 235, 189-201 (1956)

79) Unseld,H., Die Metachromasie dichroitischer und metachromatischer Farbstoffe als polarisationsoptisches Problem. Gleichzeitig ein Beitrag zum Auftreten anomaler Polarisationsfarben. Dissertation Tübingen 1961

80) Verzar,F., The ageing of collagen, Connective Tissue Symposium Blackwell Oxford 1957, 208-221

81) Wassermann,F., Feinstruktur des Bindegewebes als Grundlage der Funktion und der pathologischen Veränderungen, Verhandlg. Dtsch. Ges. f. Inn. Med., 65.Kongress, 852-862 (1959)

82) Watson,M.R. u. R.H.Smith, The chemical composition of earthworm cuticle, Biochem.J. 64. 10 p (1956)

83) Weir,C.E., 1949, zit. nach Bear[5)]

84) Wolpers,C., Kollagenquerstreifung und Grundsubstanz, Klin. Woch.schr. 22, 624 (1943)

85) Wyckoff,R.W.G., R.B.Corey u. I.Biscoe 1935, zit.bei Bear[5)]

86) Zeiger,K., Vorgänge bei den histologischen Fixationen mit chemischen Mitteln. Acta histochem. Suppl.band I, 176-204 (1958)

L e b e n s l a u f

Am 11.September 1939 wurde ich in Reutlingen geboren als Sohn des Bezirksnotars Wilhelm B e t z und seiner Ehefrau Gertrud geb. Walker. Im September 1945 trat ich in Reutlingen in die Volksschule, 1949 in die Johannes- Kepler- Oberschule ein. Seit 1954 wohne ich in Horb a.N. und legte 1958 am Gymnasium Horb die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1958 begann ich in Tübingen das Medizinstudium . Nach der Ärztlichen Vorprüfung im Oktober 1960 studierte ich ein Semester in Wien, kehrte dann nach Tübingen zurück und legte nach dem Sommersemester 1963 das Staatsexamen ab.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen